ANALES

DE LA

SOCIEDAD CIENTIFICA

ARGENTINA

Director: Cap. de Navío (R.) EMILIO L. DIAZ

ENERO-FEBRERO 1970 — Entregas I-II — TOMO CLXXXIX

SUMARIO

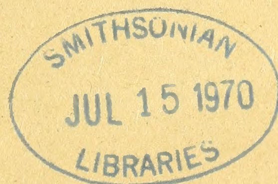
Pág.

SERIE II. CIENCIAS APLICADAS Nº 16

ANALES DE LA COMISION DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

BUENOS AIRES
Avda. Santa Fe 1145

1970



Impreso en Imprenta Coni S.A.C.I.F.I., Perú 684, Buenos Aires, República Argentina

ANALES

DE LA

SOCIEDAD CIENTIFICA ARGENTINA

DIRECTOR: Cap. de Navío (R.) EMILIO L. DIAZ

TOMO CLXXXIX

BUENOS AIRES
AVDA. SANTA FE 1145

1970

SERIE II. CIENCIAS APLICADAS Nº 16

ENSAYOS SOBRE LA ACCION BIOCIDA DEL TEGO-51
(DODECIL-DI (AMINOETIL)-GLICINA)

POR DURIEUX DE MAZZA, M. R. LANDOLFI Y A. L. MONTES[1]

RESUMEN

Se ha ensayado la actividad biocida del Tego 51 frente a nueve microorganismos que pueden contaminar los alimentos y en jugos cítricos y de uva y en leche. La actividad efectiva requiere concentraciones altas, en general, del 1,0 °/₀ al 2,0 °/₀, lo que lo torna inadecuado como aditivo.

ABSTRACT

The biocide action of Tego 51 has been investigated for nine microorganisms that frecuently contaminate foods and also citric and grape juices and milk. An effective activity needs high concentrations of Tego 51, usually from 1,0 to 2,0 per cent, which makes it inadequate as an additive for foods.

El TEGO-51, fabricado por Tego Biocide Th. Goldschmidt A.-G. Essen, es un producto dual, detergente-desinfectante, anfolito tensoactivo biocida, de acción bactericida, fungicida y virucida (activo frente a los virus de la influenza, de la fiebre porcina y de la peste de las aves), no tóxico ni corrosivo, cuya acción no es modificada por la presencia de proteínas. Su composición química corresponde a la dodecil-di(aminoetil)-glicina.

Se expende como producto concentrado, líquido oleoso límpido, de color amarillento y olor amoniacal. Se recomienda su empleo en solución al 1,0 % (del producto comercial) en agua como deter-

[1] Laboratorios de Bromatología del Depto de Quím. Organica de la Fac. de Ciencias Exactas y Naturales Bs. Aires.

gente-desinfectante para locales, equipos, cañerías, etc. y aseo personal en fábricas, hospitales, etc. ([1-8]).

Dadas sus propiedades antisépticas, ampliamente ensayadas y que se asegura no es tóxico para el hombre, podría pensarse en su empleo como preservador en algunos tipos de alimentos; directamente como aditivo, o aprovechando los residuos de su aplicación como detergente-antiséptico en cañerías, tanques, recipientes y equipos diversos.

Por este motivo se han realizado los ensayos que se describen a continuación, sobre su efectividad como antiséptico frente a varios microorganismos que pueden contaminar los alimentos y como aditivo en algunos alimentos determinados.

ENSAYOS MICROBIOLOGICOS

I. Se investigó su acción biocida sobre varios microorganismos del grupo de "enterobacterias', contaminantes corrientes de alimentos, usando cepas de:

Nº 1 *Salmonella oranienburg* Nº 2 *Salmonella typhimurium;*
Nº 3 *Proteus morganii* Nº 4 *Proteus mirabilis;*
Nº 5 *Escherichia coli* Nº 6 *Aerobacter aerogenes;*
Nº 7 *Staphilococcus aureus* Nº 8 *Bacillus cereus*
Nº 9 *Streptococcus sp.*

Como medio de cultivo se usó caldo nutriente (preparado con 3 g de extracto de carne "Anglo" y 5 g de Triptona Oxoid a un litro y pH 6,8) que se distribuyó en porciones de 10 ml en tubos de ensayos para efectuar los ensayos. Se hizo la incubación a 37° C.

Según puede apreciarse en el cuadro Nº 1, para una población bacteriana de 1 a 5 millones por mililitro se manifiesta actividad frenadora del desarrollo en concentración de 0,5 por ciento y la acción es bactericida para una concentración del 1,8 por ciento, con excepción del Proteus morganii, que se manifiesta resistente. El P. mirabilis también presenta mayor resistencia que otros microorganismos ensayados, pero sucumbe a la concentración del 1,8 por ciento.

Si la población microbiana es menor (ver Cuadro Nº 2) la eficacia del Tego 51 es mayor, siendo neta la acción biocida en concentración de 1,0 %, con la excepción del P. morganii.

CUADRO 1

Ensayo con Tego 51 incorporado al medio de cultivo para población bacteriana 1 a 5×10^6/ml

Cepa N°	Control			0,5 °/₀ Tego			1,0 °/₀ Tego			1,8 °/₀ Tego		
	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
1	++	++++	++++	+	+	+	±	±	±	—	—	—
2	+	++++	++++	±	±	+	±	±	—	—	—	—
3	++	++++	++++	±	++++	++++	—	++++	++++	—	—	++
4	++	++++	++++	±	+	++++	±	±	±	—	—	—
5	++	++++	++++	±	±	±	±	±	±	—	—	—
6	+	+++	++++	—	+	+	—	±	±	—	—	—
7	—	++	+++	—	+	+	—	±	±	—	—	—
8	—	++	++	—	+	+	—	±	±	—	—	—
9	—	++	++	—	—	+	—	±	±	—	—	—

CUADRO 2

Ensayos con Tego 51 incorporado al medio de cultivo para población bacteriana de 1 a 5×10^5/ml

Cepa N°	Control			0,5 °/₀ Tego			1,0 °/₀ Tego			1,8 °/₀ Tego		
	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
1	—	+++	++++	—	—	++	—	—	—	—	—	—
2	—	+++	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	+++	++++	—	+++	++++	—	+++	++++	—	—	++
4	—	+++	++++	—	—	+++	—	—	—	—	—	—
5	—	+++	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	+++	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	+++	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	+++	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Cabe señalar que aunque el Tego 51 se manifiesta efectivo contra 8 de los nueve microorganismos ensayados, la concentración necesaria es relativamente elevada comparada con la requerida para otros antisépticos.

II. Se aplicó Tego 51 a la preservación de leche higienizada, de bajo recuento bacteriano, con el siguiente resultado:

CUADRO 3

Ensayos en leche

Leche	Control por recuento y observación por estado físico		
	0 h	24 ha	48 h
Tal cual	5000 microorg/ml fluída	2 × 10^8/ml, cortada	incontables, cortada
Con 0,5 °/₀ de Tego 51.........	ídem	incontables en dil. 1/10.000 cortada	incontables, corda
Con 1,0 °/₀ de Tego 51.........	ídem	incontables en dil. 1/1000 fluída	incontables, fluída (se corta a los 5 días)

Nota. — Los ensayos se mantuvieron a 20° C.

El efecto preservador se manifestó con una concentración de 1,0 % de Tego 51; no se corta la leche aunque hay proliferación de flora; pero la leche se torna muy espumosa con esa concentración del aditivo.

En leche común pasteurizada (con recuentos altos) no se observó acción preservadora efectiva, produciéndose coagulación expontánea el día siguiente, a 20° C.

III. *Jugos cítricos.* Se ensayó la acción preservadora del Tego 51 en jugos de naranja y de pomelo con su flora natural, con los siguientes resultados:

Jugo	Recuentos después de incubar a 25° C ; microb/ml		
	0 h	24 h	48 h
1. *Naranja :*			
Testigo	15×10^7	incont. dil. $1/10^6$	19×10^{10}
+ 0,5 °/₀ Tego 51 ..	ídem	incont. dil. $1/10^3$	18×10^7
+ 1,0 °/₀ » ..	ídem	1×10^6	25×10^8
+ 2,0 °/₀ » ..	ídem	—	4×10^1
2. *Pomelo :*			
Testigo	1×10^4	incont. dil. $1/10^6$	1000×10^{12}
+ 0,5 °/₀ Tego 51..	ídem	526×10^3	4×10^{10}
+ 1,0 °/₀ » ..	ídem	5×10^5	4×10^8
+ 2,0 °/₀ » ..	ídem	—	3×10^4

Se ha comprobado que baja el recuento, pero no en forma realmente efectiva a menos que se emplee en concentración del 2,0 %.

IV. *Jugo de uva.* Se emplearon jugos de uva del comercio, de los que se eliminó el ácido sulfuroso usado como preservador, por destilación en medio ácido mineral, que luego fue eliminado.

Se ensayaron diversos microorganismos como contaminantes de los jugos, que originariamente estaban estériles; a saber: *Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Streptococcus lactis, Lactobacillus acidophillus* y *Staphilococcus albus.* Solamente desarrollaron bien en los jugos los dos primeros, el último después de varios días.

Los resutados obtenidos fueron los siguientes, que ponen de manifiesto una gran sensibilidad de la levadura frente al Tego 51; en tanto que la del *Aspergillus niger* resulta mucho menor, no bastando ni aun una concentración del 2,0 % para impedir totalmente su desarrollo.

V. *Investigación de la adición de Tego 51.* Para investigar la adición de Tego 51 en leche y jugos cítricos se aplicó la técnica de Auerbach modificada (9), en la siguiente forma:

a) Se trabajó sobre 10 ml del producto que contenía 1,0 % de Tego 51. Se agregó igual volumen de acetona para precipitar las proteínas; se agitó, dejó precipitar y filtró;

Jugos de uva	Recuentos después de incubar a 30° C microb./ml en 24 h
Testigos	sin desarrollo de colonias
1. Inoculados con *Sacch. cerevisiae*	incontables en dil. $1/10^3$
+ 0,5 % de Tego 51	no se aprecia desarrollo
+ 1,0 % de Tego 51	no se aprecia desarrollo
+ 2,0 % de Tego 51	no se aprecia desarrollo
2. Inoculados con *Asp. niger*	22 colonias por ml
+ 0,5 % de Tego 51	5 » »
+ 1,0 % de Tego 51	3 » »
+ 2,0 % de Tego 51	2 » »

b) al líquido límpido filtrado se agregó 2 ml de solución al 1 por mil de azul de bromofenol;

c) se eliminó la acetona por burbujeo de aire a temperatura ambiente. Al respecto conviene mencionar que si la eliminación de acetona se hace por calentamiento en baño de maría la reacción para Tego resulta luego negativa; de modo que el calentamiento provoca una modificación sustancial del Tego 51.

d) eliminada la acetona se filtró y el líquido claro fue acidificado con ClH diluido. La solución quedó de color anaranjado neto;

e) extrayendo con cloroformo se obtuvo una solución clorofórmica anaranjada y por agitación de ésta con solución alcalina, la última quedó coloreada en azul.

La técnica descripta, usada para investigar compuesto de amonio cuaternario, ha dado buen resultado para investigar Tego 51 en dilución al 1,0 % del producto comercial y en leches y jugos cítricos.

CONCLUSIONES

El Tego 51 tiene acción microbicida; pero en concentración relativamente alta, en general del orden del 1,0 % al 2,0 %. Esta concentración hace espumoso al producto que lo contiene. A pesar de que se asegura que el Tego 51 no es tóxico, sin embargo una concentración tal de un producto tensioactivo no parece recomendable para la actividad normal de las enzimas digestivas.

BIBLIOGRAFIA

1. *Folleto de los fabricantes*. Tego. Desinfektions Technik. Th. Goldsmidt G-Essen.

2. *Folleto de los fabricantes*. Tego. Desinfection throughout the Werld.

3. Mülhens, K. 1957. En Argh. Hyg. u. Bakt *141* Heft 5.

4. Müller, R. 1950. En Med. Mikrobiologie *4* Anfl 141-160.

5. Kraus, H. 1958. En Arch Lebensmittel hyg. *9*, 73.

6. Hunnius, C. 1959. En Pharm. Werterbuch *3* Aufl.

7. Frisby, B. R. 1959. Lancet *2*, 57.

8. Braub, F. W. 1959. Arch. Hyg. u. Bakt. *143*, 141

9. Montes, A. L. 1964. *Curso de Bromatología*, p. 253, Proel Ed. ; Bs. Aires.

Recibido el 26 de mayo de 1969

SERIE II, CIENCIAS APLICADAS, Nº 16

EMPLEO DE NEUTRONES DE 14 MEV PARA LA DETERMINACION INDIRECTA DE ALUMINA EN PRODUCTOS TERMINADOS DE SAP

POR CARLOS E. ESPAÑOL Y ANA MARIA MARAFUSCHI [1]

RESUMEN

Se ha aplicado la técnica de determinación de oxígeno por activación de neutrones rápidos mediante la reacción ^{16}O (np) ^{16}N y midiendo la actividad del ^{16}N de 7, 4 segundos de período y radiaciones gamma de 6,13-7,13 Mev.

Se ha utilizado el generador de neutrones IMICAN-CISE de 150 Kv con el cual se obtienen neutrones de 14 Mev por reacción (dt) sobre blancos de tritio-titanio de 4 curie por pulgada cuadrada.

Las muestras se han irradiado durante 30 segundos y la actividad total del ^{16}N de las mismas se determinó contando durante 10 intervalos de 2 segundos cada uno e integrando gráficamente los resultados.

Se utilizaron como patrones piezas de iguales dimensiones hechas de nylon y SAP de composición conocida.

Los resultados obtenidos están indicados en las tablas I y II. El método resulta rápido y competitivo con los métodos químicos convencionales por su rapidez, sensibilidad y exactitud en el rango de concentraciones de oxígeno analizadas.

ABSTRACT

Fast neutron of 14 Mev produced in a IMICAN-CISE generator of 150 Kv, by the (d, t) reaction in a tritium-titanium target, were used in the indirect determination of Al_2O_3.

The samples were irradiated during 30 seconds and the total ^{16}N activity was determined by counting during ten intervals of 2 seconds each and working out graphical integration of results.

As standards we used pieces of identical dimensions made of nylon and S. A. P. of known composition. Results are shown in Tables I and II.

The method is competitive with the conventional chemical ones in speed, sensibility and precision, for the analysed oxygen concentration intervals.

[1] Laboratorio de Radioisótopos. Departamento de Física. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Buenos Aires. Argentina.

Trabajo presentado en el Décimo Congreso Latinoamericano de Química, celebrado en Costa Rica en Febrero de 1969.

INTRODUCCION

Se ha utilizado la técnica de determinación del oxígeno mediante activación con neutrones rápidos como método indirecto para la determinación de alúmina en productos terminados de SAP (Sintered Aluminum Powder). El SAP es un sinterizado de alúmina en una matriz de aluminio con un contenido de óxido que varía del 4 al 14 %. Debido a su pequeña sección eficaz para la absorción de neutrones térmicos se ha propuesto como material de camisas para las barras de los reactores. Tiene la ventaja respecto del aluminio de que como consecuencia de la dispersión de la faz refractaria tiene mayor punto de fusión. Presenta sin embargo el inconveniente de ser frágil lo cual pone un serio límite a su posible aplicación. Sus propiedades mecánicas y en consecuencia la posibilidad de trabajado del mismo dependen del contenido y la homogeneidad de la dispersión de la alúmina en la matriz de aluminio.

El presente trabajo tiene por objeto controlar el contenido y la homogeneidad de la dispersión de la faz alúmina en barras de SAP fabricadas por extrucción. Los métodos químicos convencionales para la determinación de alúmina en el SAP son sumamente laboriosos y lentos. Se basan en la volatilización del aluminio en corriente de ácido clorhídrico gaseoso y anhídrido a la temperatura de 400° C y posterior dosaje de aluminio en el residuo de alúmina e impurezas. Resulta por ello ventajoso el empleo de un método más rápido como el análisis por activación con neutrones rápidos mediante la reacción $^{16}O(np)^{16}N$ [1-4]. La sección eficaz de la reacción es bastante baja, 40 mb a 14,5 Mev, pero de utilidad práctica en el rango de las concentraciones de oxígeno a analizar.

Es la reacción más comúnmente utilizada debido a la existencia de generadores de neutrones de 14 Mev de fácil operación y bajo costo. Además ofrece la posibilidad de detección tanto de partículas beta como de fotones gamma de alta energía. En efecto el ^{16}N de 7,4 seg de período de semidesintegración emite negatrones de 3,3 4,4 y 10,4 Mev y fotones gamma de 6 a 7 Mev de energía. Esta técnica de determinación de oxígeno es específica con muchas muestras, pero si existen interferencias es posible eliminar las mismas mediante pantallas absorbentes para la radiación beta [1] o utilizando un alto nivel de discriminación para la radiación gamma [2].

La determinación del contenido de oxígeno depende de la me-

dida de la actividad del ^{16}N la cual tiene una baja sensibilidad debido a su corto período y a la baja eficiencia de los detectores de centelleo a altas energías gamma. Para el cálculo se ha modificado el método integral descripto por Pauly y Girardi ([5]) en el cual se eligen las condiciones de mayor sensibilidad y precisión para las condiciones experimentales correspondientes al dosaje de oxígeno.

Cuando se mide la actividad total de una fuente de baja actividad y de período corto, es necesario emplear un tiempo de contaje óptimo.

Sea N_0 el número total de átomos del nucleído radioactivo de constante de desintegración λ y $p = 1\text{-}\exp(-\lambda t)$ la probabilidad de desintegración de los mismos. Si b es el valor medio de la actividad de fondo, como el valor medio de una suma de variables aleatorias es igual a la suma de los valores medios, resulta:

$$N(t) = N_0[1 - \exp(-\lambda t)] + bt \qquad [1]$$

expresión que da el número medio de cuentas totales que se van acumulando a medida que transcurre el tiempo.

Por otro lado la desviación noventa y cinco por ciento relativa al número de nucleídos que desintegran estará dada por

$$\varepsilon(t) = 2\sqrt{N_0[1 - \exp(-\lambda t)] \,.\, \exp(-\lambda t) + bt} \,/\, N_0\, exp(-\lambda t) \qquad [2]$$

Del valor que hace $\varepsilon'(t) = \varepsilon''(t) = o$, resulta

$$N_0\lambda/b = \exp(\theta) - \{2\theta/[1 - \exp(-\theta)]\}$$

donde el primer miembro de la ecuación representa la actividad inicial de la fuente en términos de la actividad de fondo y $\theta = \lambda t$ es el tiempo óptimo de contaje expresado en unidades de la vida media del nucleído.

Por otra parte si este tiempo óptimo de contaje se divide en intervalos iguales sucesivos resulta la expresión

$$A_0/b = exp(p\lambda\theta) - \{2p\lambda\theta/[1 - \exp(-p\lambda\theta)]\} \qquad [3]$$

que permite deducir el número de lecturas sucesivas p en función de la relación de actividades fuente-fondo.

Por otro lado reordenando [2] resulta una ecuación de segundo grado en N_0 cuya solución es

$$N_0 = 2 \exp(-\lambda t) / [1 - \exp(-\lambda t)] \left\{ 1 + \sqrt{\varepsilon^{-4} + bt\, \varepsilon^{-2} \exp(2 \lambda t)} \right\}$$

o sea que la actividad mínima detectable con un error relativo del cien por ciento es

$$A_0 = 2 \lambda \exp(-\lambda t) / [1 - \exp(-\lambda t)] \left\{ 1 + \sqrt{bt \exp(2 \lambda t)} \right\} \quad [4]$$

Por otro lado llevando el valor $t = p\theta$ correspondiente al tiempo óptimo a la ecuación [1] y tomando logaritmos en ambos miembros, se obtiene

$$\lg (A - pb\theta) - \lg [1 - \exp (p\lambda\theta)] = \lg A_0$$

o sea la ecuación de una recta paralela al eje de abscisas

$$\lg [1 - \exp (p\lambda\theta)]$$

y cuya ordenada al origen da la actividad integral corresponde al nucleído considerado.

Aplicando los resultados expresados por las ecuaciones [3] [4] y [5] al caso particular de la determinación de una actividad baja de ^{16}N de 7,4 seg de período que es el nucleído que nos interesa en este caso, se llega a las siguientes conclusiones:

1 — Basta una serie de 10 mediciones sucesivas de 2 segundos de duración cada una.

2 — La actividad mínima detectable depende del valor de la actividad de fondo correspondiente al nivel de discriminación utilizado y puede calcularse según la relación

$$Q_0 = 0{,}03 \left[1 + \sqrt{105\, b} \right]$$

3 — El método integral descripto tiene la ventaja de permitir determinar contribuciones extrañas en la actividad medida, pues las mismas originan una desviación del paralelismo con el eje de las abscisas, tal como se indica en la figura 6.

PARTE EXPERIMENTAL

Descripción del equipo utilizado

Se ha empleado el acelerador IMICAM-CISE de 150 kV como generador de neutrones de 14 Mev mediante la reacción $^{3}T(dn)^{4}He$ (3).

Las figuras 1 y 2 muestran un esquema de la instalación y una vista de la cabeza del acelerador. La fuente de alta tensión está constituída por un generador tipo Cockcroft-Walton, con un sistema rectificador-multiplicador de tensión construído con díodos de selenio. La fuente de iones es de tipo de radiofrecuencia con campo magnético axial. El rendimiento de la misma se controla regulando la presión del gas, el potencial de extracción, la intensidad del campo magnético axial y la potencia de la radiofrecuencia. La presión de gas se controla con una válvula de aguja que regula el flujo del gas proveniente de un tubo de deuterio (99,5 %) que se encuentra en el interior de la cabeza del acelerador. La tensión de extracción se regula hasta obtener el máximo de corriente iónica que depende a su vez de los valores de los otros parámetros experimentales. La fuente de tensión de 6 kV-15 ma de corriente máxima, constituída por un transformador y rectificadores de selenio, se encuentra también en la cabeza del tubo acelerador.

El tubo acelerador (*t*) está en posición horizontal por comodidad de acceso a sus diferentes partes. Una bomba rotativa para el prevacío (*r*) y una difusora de mercurio (*d*) permiten obtener un vacío del orden de 10^{-5} mm de Hg. Entre la cabeza a alta tensión y la parte terminal conectada a masa existe un solo electrodo intermedio a potencial variable que trabaja como focalizador electrostático. Un electrodo adicional (*e*) colocado en la parte terminal del tubo acelerador, intercepta la corona externa del haz de deuterones. La corriente iónica recolectada por el mismo permite regular la focalización de forma tal que puede utilizarse la totalidad de la superficie del blanco (*b*). Con el objeto de aumentar la duración del blanco una pantalla de aluminio colocada en el tubo de aceleración antes del mismo, permite interceptar automáticamente el flujo de deuterones cuando finaliza la irradiación. La pantalla es comandada en el momento en que la muestra deja de accionar un interruptor convenientemente colocado en el cabezal del blanco.

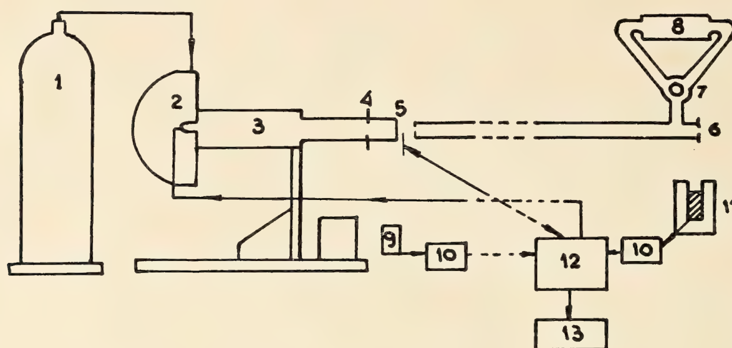


Fig. 1. — Esquema de la instalación : 1, fuente de alta tensión ; 2, fuente de iones ; 3, tubo acelerador ; 4, electrodo de focalización ; 5, soporte del blanco de tritio ; 6, tubo neumático ; 7, válvula ; 8, compresor : 9, cristal de Hornyak ; 10, amplificador ; 11, cadena de contaje ; 12, programador ; 13, unidad de contaje.

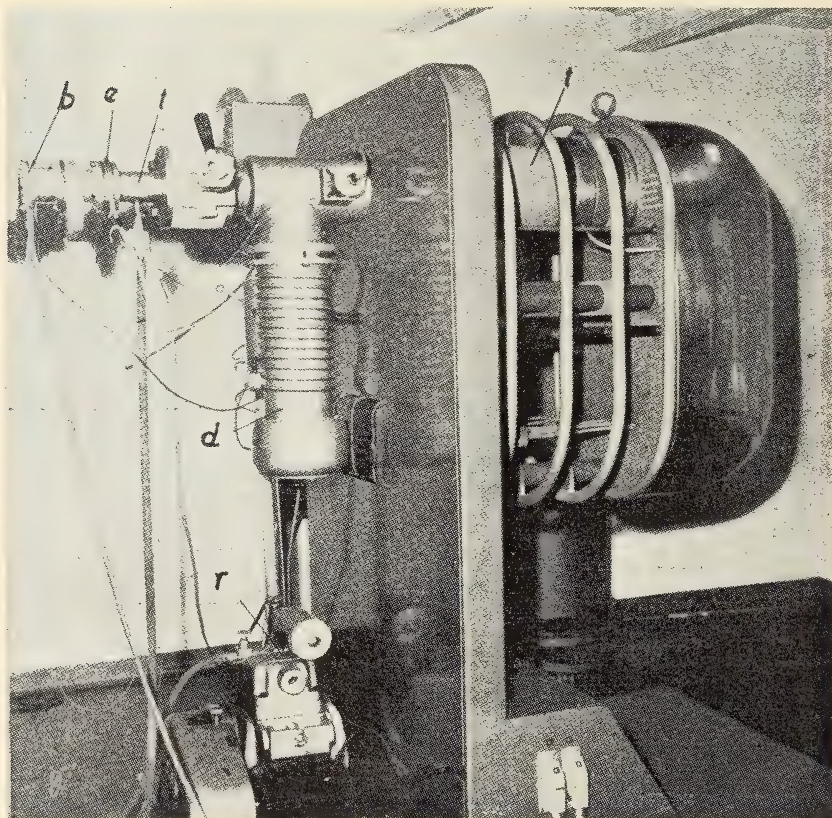


Fig. 2. — Vista del generador de neutrones : *t*, tubo acelerador ; *e*, electrodo de focalización ; *b*, blanco ; *d*, bomba difusora ; *r*, *b*, bomba rotativa.

Las muestras se trasladan a la zona de irradiación mediante un tubo neumático. Cuando están colocadas en posición correcta funciona un interruptor que es el mismo que actúa sobre la pantalla interruptora ya citada. En el momento en que finaliza la irradiación se invierte la presión de aire mediante una válvula de manera tal que la cápsula es aspirada por el tubo neumático, tardando aproximadamente 10 seg para llegar a la zona de contaje. Cuando el interruptor se libera actúa un sistema progamador en forma tal que simultáneamente con la intercalación de la pantalla se origina una caída de la tensión de extracción de deuterones y se interrumpe el contaje de los neutrones producidos. Se inicia entonces el contaje de la actividad gamma de la muestra irradiada.

El equipo de contaje está constituído de un cristal de INa (Tl) con fotomultiplicador Dumond conectado a un amplificador modelo AM2 con umbral de discriminación entre 0,2 y 4,2 voltios, escalímetro modelo CT6, unidad de prefijado de tiempo TM4, y una estampadora Olivetti modelo ST2.

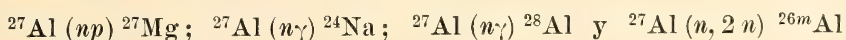
Irradiación

Muestras individuales colocadas en una cápsula de irradiación, son bombardeadas durante 30 segundos y transferidas al detector de INa (Tl) mediante el sistema neumático descripto. La cápsula de irradiación está constituída por un cilindro de polietileno de 20 cm de largo y 7 cm de diámetro.

Las determinaciones se realizan comparando las actividades de las muestras incógnitas de SAP con muestras patrones de nylon que tienen contenido de oxígeno de 105 mg. También se ha empleado como patrón una muestra de SAP previamente analizada por método químico con un contenido de 4 % de Al_2O_3. Muestras y patrones son piezas cilíndricas de 11 mm de largo y 10 mm de diámetro. Dado que ambas no se irradian simultáneamente, se mide el flujo de neutrones producido con un cristal Hornyak.

Contaje

Las condiciones experimentales de detección están determinadas por las posibles actividades interferentes. Las mayores posibilidades de interferencia provienen de las reacciones con el aluminio de la matriz:


$^{27}Al\,(np)\,^{27}Mg$; $^{27}Al\,(n\gamma)\,^{24}Na$; $^{27}Al\,(n\gamma)\,^{28}Al$ y $^{27}Al\,(n, 2\,n)\,^{26m}Al$

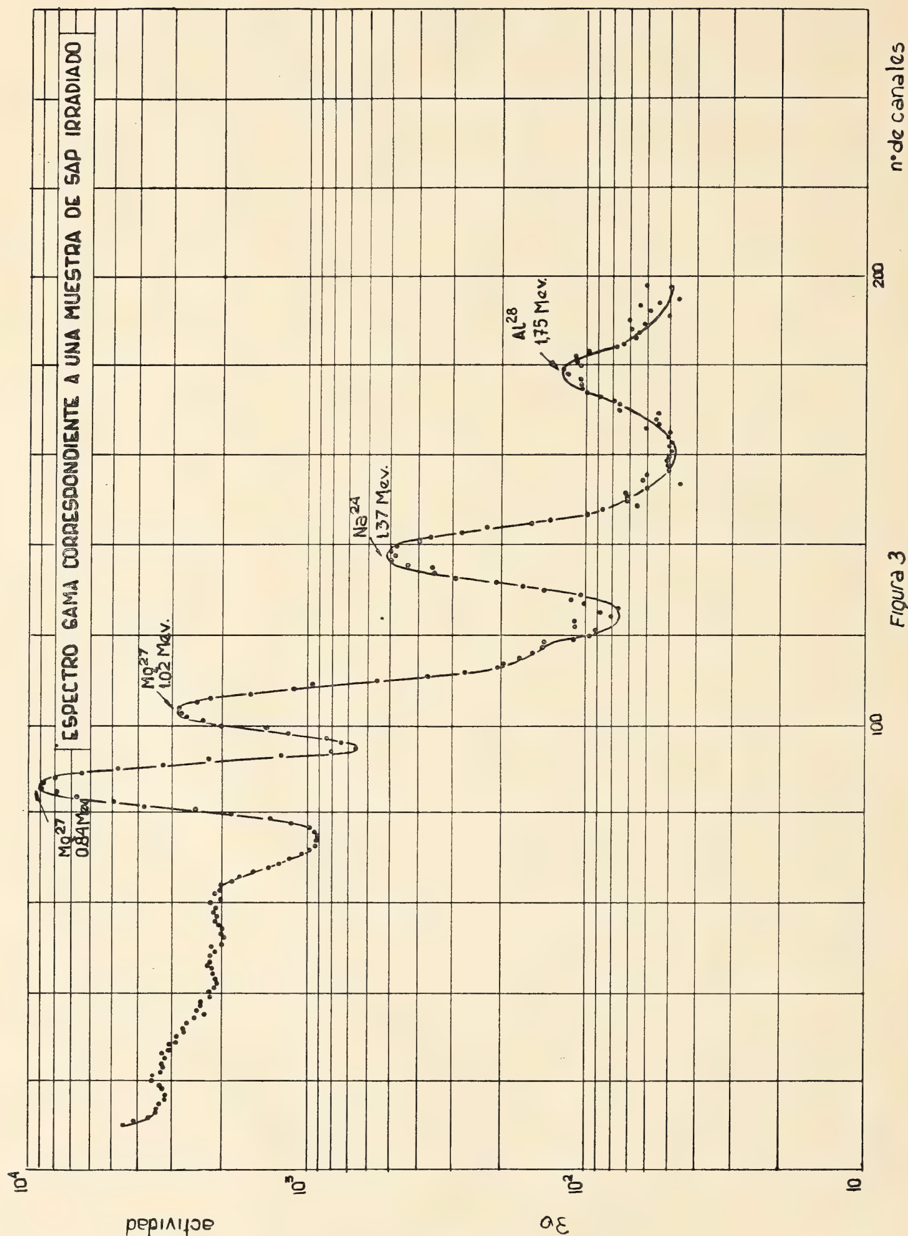


Fig. 3. — Espectro gomma correspondiente a una muestra de SAP irradiado : se observan solamente las actividades correspondientes al ^{27}Mg, ^{24}Na y ^{28}Al

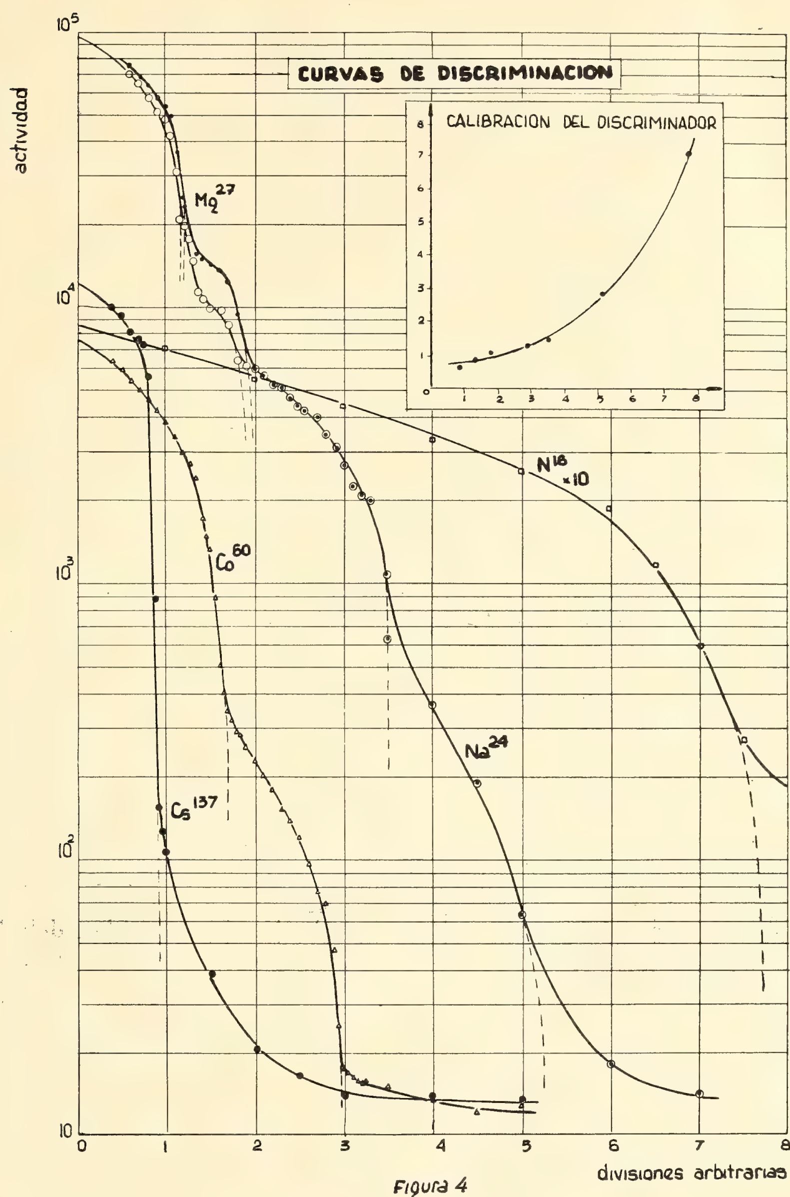


Fig. 4. — Curvas de discriminación: actividades en función del nivel de discriminación para ^{137}Cs, ^{60}Co, ^{27}Mg, ^{24}Na y ^{16}N. En el ángulo la curva de calibración del discriminador. Energía en Mev, en función de posición del discriminador (divisiones arbitrarias).

Esta última puede despreciarse dado el valor ínfimo de su sección eficaz y el valor de 13 Mev para la energía umbral de la reacción. En efecto, en la figura 3 correspondiente al espectro gamma de una muestra de SAP irradiada durante dos minutos y medida inmediatamente con un analizador de impulsos multicanal, no se observa ninguna otra contribución a la actividad total de la muestra. Por ello el umbral de discriminación se eligió sobre la base de que las únicas interferencias presentes eran ^{27}Mg y el ^{24}Na.

En la figura 4 se muestra las curvas de discriminación correspondientes a las radiaciones gamma del ^{24}Na, ^{27}Mg y ^{16}N. La curva de discriminación del ^{16}N decrece muy lentamente, en cambio las ^{27}Mg y ^{24} Na disminuyen rápidamente; es pues fácil discriminar completamente estas radiaciones. Para la determinación experimental de la curva de discriminación se utilizaron ^{137}Cs, ^{27}Mg, ^{60}Co y ^{24}Na.

Las mediciones de actividad del ^{16}N se realizaron con geometría 2π contando todos los pulsos superiores a 3 Mev. En estas condiciones la sensibilidad del método, para la determinación de oxígeno es de 0,2 mg con un fondo natural de 150 cpm, tal como surge de los datos de la figura 5 que muestra la dependencia de la sensibilidad con el nivel de discriminación.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La determinación del contenido de oxígeno depende de la medida de la actividad del ^{16}N, la cual tiene una baja sensibilidad debido a su corto período y a la baja eficiencia de los detectores de centelleo a altas energías gamma. Para el cálculo se ha utilizado el método integral descripto por Pauly y Girardi ([5]) en el cual se eligen las condiciones de mayor sensibilidad y precisión para las condiciones experimentales correspondientes al dosaje de oxígeno.

Después de la irradiación las muestras son transportadas rápidamente y son contadas durante $p = 10$ intervalos de $\theta = 2$ seg. de duración cada uno, despreciándose el intervalo de 0.1 segundo necesario para el registro numérico de los datos. Utilizando el nomograma de la figura 6, si para cada uno de los valores de p se representa en ordenadas el correspondiente valor de Yp deducido de las medidas de actividad restando el fondo determinado previamente,

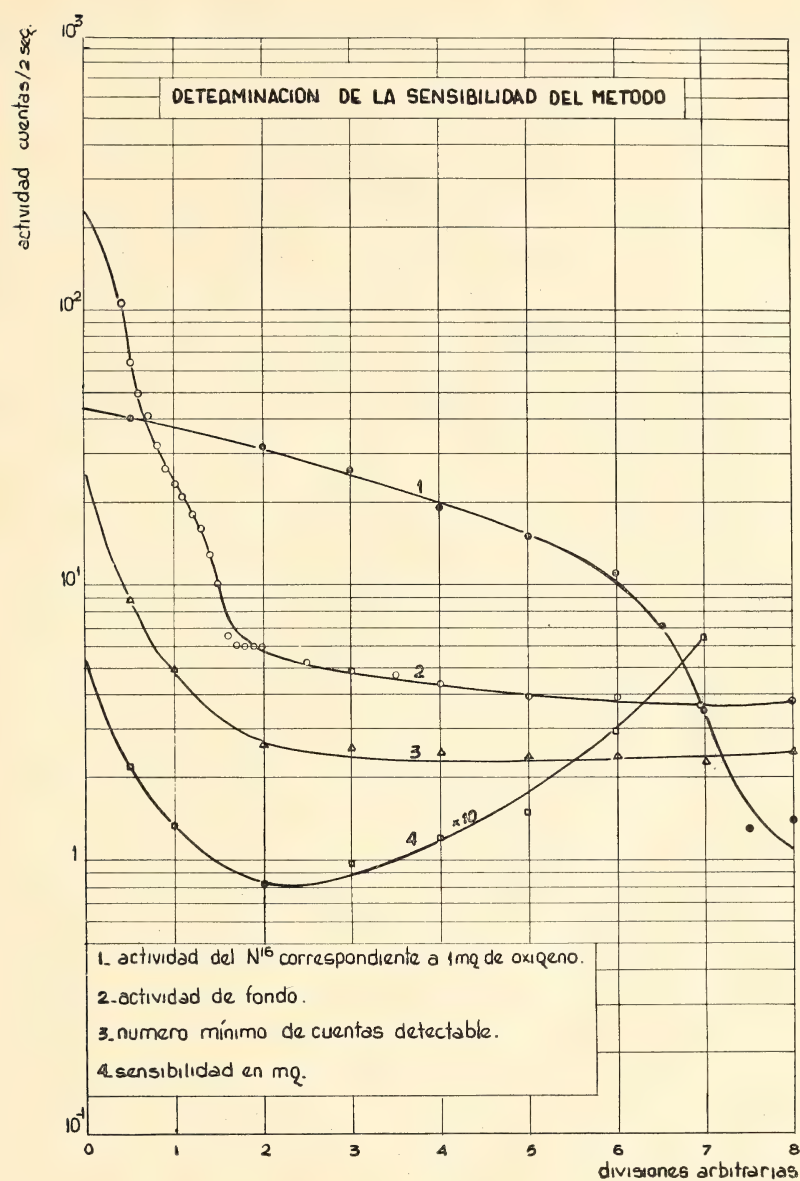


Fig. 5. — Determinación de la sensibilidad del método : 1, actividad del ^{16}N correspondiente a 1 mg de oxígeno ; 2, actividad de fondo ; 3, númeio mínimo de cuentas detentables ; 4, sensibilidad en mg.

se obtiene una paralela al eje de las abscisas (JK) cuya extrapolación permite determinar el número de impulsos totales originados por desintegraciones del ^{16}N. Las medidas se normalizan para un

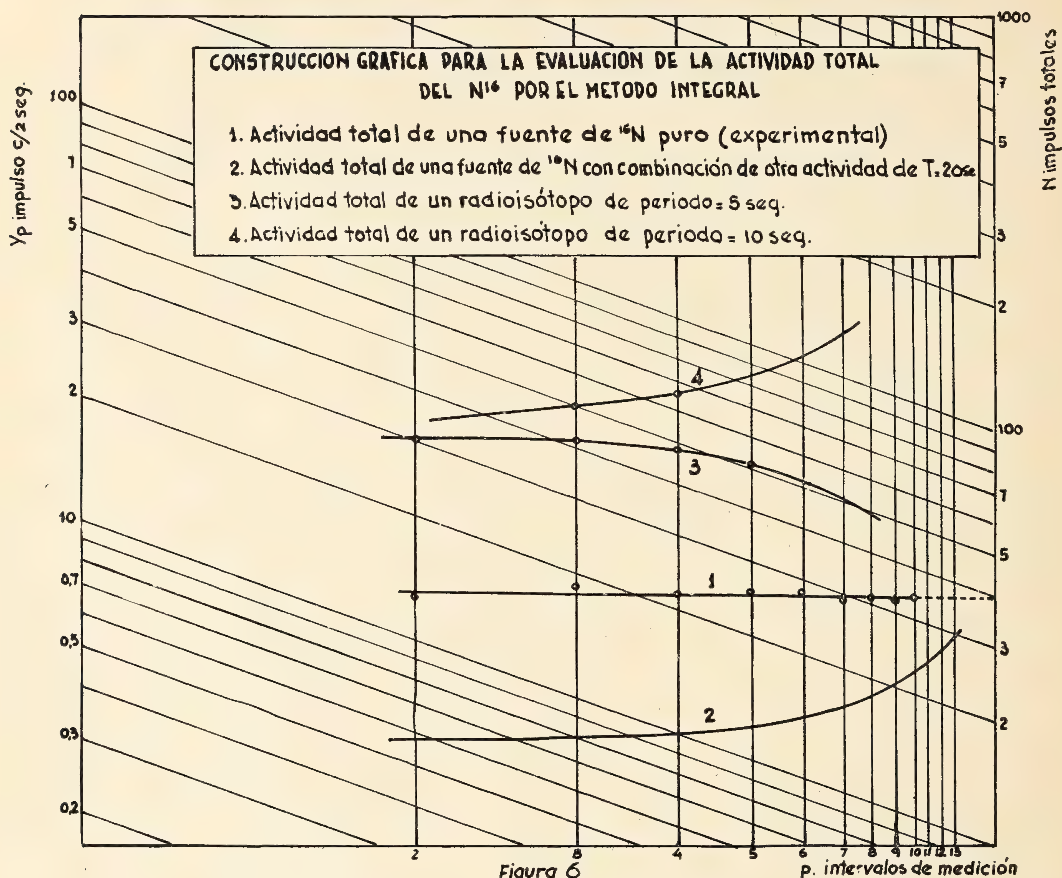


Fig. 6. — Construcción gráfica para la evaluación de la actividad total : 1, actividad total de una fuente de ^{16}N puro (experimental ; 2, actividad total de una fuente de ^{16}N adicionada de otra actividad de 20 segundos de período ; 3, actividad total de un radioisótopo de 5 segundos de período ; 4, actividad total de un radioisótopo de 10 segundos de período.

dado valor del tiempo de decaimiento y del flujo de neutrones rápidos.

Los resultados obtenidos utilizando como patrón muestras de nylon y de muestras SAP (4 % Al_2O_3) se indican en la Tabla 1. Las denominaciones T y C en las mismas indican muestras de cabeza y pie de barras de SAP de 2 metros de longitud fabricados por estru-

TABLA I

Contenido de alúmina en SAP. Patrón : SAP (4 % Al_2O_3)

Muestra	Peso (g)	Determinaciones	Desviación standard	Valor medio % Al_2O_3	Error del valor medio	Error % del valor medio
FF 23 C....	2,154	10	0,41	4,26	0,13	3
FF 24 T....	2,132	10	0,45	4,74	0,14	4
FF 20 C....	2,177	6	2,20	10,90	0,90	8
FF 24 C....	2,131	10	0,56	4,31	0,18	3
FF 20 T....	2,192	6	1,17	10,16	0,48	8,5

TABLA II

Conienido de alúmina en SAP. Patrón : nylon (106 mg oxígeno)

Muestra	Peso (g)	Determinaciones	Desviación standard	Valor medio % Al_2O_3	Error del valor medio	Error % del valor medio
FF 23 T....	2,030	22	0,46	3,65	0,10	2,5
FF 23 C....	2,154	12	0,42	3,74	0,12	3,5
FF 24 T....	2,132	11	0,43	4,04	0,12	3,0
FF 24 C....	2,131	10	0,52	3,72	0,16	4,5
FF 20 C....	2,177	9	1,055	9,13	0,35	4,0
FF 20 T....	2,192	15	1,19	9,55	0,32	3,0

sión en caliente. Los cuatro primeros corresponden a un mismo tipo de SAP —4 % Al_2O_3 aproximadamente y los dos últimos a otro tipo de SAP —10 % Al_2O_3 aproximadamente.

Se llega a la conclusión que el método tiene una precisión menor que la que se obtiene aplicando el método químico previamente descripto, pero su rapidez justifica el empleo en este caso donde la precisión obtenida es suficiente desde el punto de vista metalúrgico.

La precisión puede aumentarse aumentando el flujo neutrónico, disminuyendo el tiempo de tránsito de la muestra irradiada y utilizando un monitor interno de flujo.

Se ha utilizado por ello el aluminio de la matriz como un monitor interno de flujo a través de ^{27} Mg de 8,9 minutos de período y radiación gamma de 0.84 Mev y 1.02 Mev, formado por reacción (np) sobre el aluminio de la matriz. La actividad específica del ^{27}Mg a tiempo cero es proporcional al flujo de neutrones rápidos incidentes. Las medidas de la actividad del ^{27}Mg se realizan dos minutos después del fin de la irradiación, utilizando un nivel de discriminación de 0,5 Mev y contando durante cinco intervalos de un minuto en las mismas condiciones de geometría que se utilizó para determinar la actividad del ^{16}N.

Se deduce que en efecto se obtiene una mayor precisión con el método del standard interno, pero el tiempo empleado para cada determinación es mucho mayor.

Se observa que los resultados obtenidos cuando se utiliza patrones de nylon son menores de los que resultan cuando se emplea un patrón de SAP de composición conocida, debido presumiblemente a la diferencia de dispersión de neutrones en ambos.

Agradecimiento. — Los autores agradecen al Dr. F. Girardi y al desaparecido Dr. J. Pauly sus valiosas sugerencias durante el transcurso de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Auboin G., Guazzoni P., Laverlochére J., Rapport C. E. A. Nº 2358 (1963).
2. Veal D. J., Cool C. F., Analytical Chemistry 34, 178 (1962).
3. Mangialojo I., Principe P., Tonolini F., Energia Nucleare 8, 237 (1961).
4. Cerrai E., Gadda F., Energia Nucleare 9, 317 (1962).
5. Girardi F., Pauly J., Sabbioni E., E. U. R. 2290 (1965).

SERIE II. CIENCIAS APLICADAS, Nº 16

DETERMINACION DE CINC Y BARIO EN ACEITES LUBRICANTES POR ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X

Por E. MATERA, E. L. MATUS y A. G. ALVAREZ [1]

RESUMEN

Se ha desarrollado un método rápido para la determinación de zinc y bario en aceites lubricantes y en aditivos concentrados. Para eliminar posibles interferencias de materiales extraños se agrega a la muestra un aditivo del mismo tipo químico.

El cómputo de la concentración de cada uno de los elementos se realiza mediante métodos gráficos o analíticos.

ABSTRACT

A fast method for the determination of barium and zinc in lubricating oils and additive concentrates has been developed. The aggregate to the sample of an additive of the same chemical type having the same cation is made to eliminate possible interferences of foreign matter to system.

The computation of the concentration of each of the elements is made from graphic or analytical methods.

INTRODUCCION

La gran importancia alcanzada por la espectrometría de Rayos X en los últimos años, unida a la rapidez con que pueden realizarse las determinaciones, hacen que cada día sea adoptada más como técnica analítica.

[1] Laboratorio Petrotécnico de Yacimientos Petrolíferos Fiscales, Fcio. Varela, Buenos Aires, Argentina.

Los trabajos publicados sobre análisis de aditivos en aceites lubricantes no son muy numerosos. Davis y Van Nordstrand ([1]), Haycock ([2]), entre otros han trabajado sobre los elementos aquí considerados, en aceites lubricantes.

Recientemente Jenkins y de Vries ([3]), describen un método de determinación por sobreagregado del elemento a determinar a la solución original. Esta idea es la que se ha adoptado a nuestro sistema.

Instrumentación. — El instrumento utilizado en este Laboratorio es un Philips PW 1540, equipado con tubo de 2 KW, ánodo de Cr, y cristal de LiF. Se ha usado para el Zn un voltaje de 50 KV y una corriente de 20 mA, y para el Ba, 90 KV y 7 mA.

METODO

Consideraciones generales. — Por sobreagregado a la muestra de aceite lubricante original, de aditivo, en el que se conocen las concentraciones de Zn y de Ba, se puede determinar, la concentración de cada uno de los elementos que contiene el aceite originalmente, es decir antes del sobreagregado. Se toma el número de cuentas por minuto en el pico de cada elemento para dos soluciones de aceite con diferente sobreagregado, y se calcula la concentración original.

El número de cuentas, puede ser reemplazado por medición de la altura del pico.

Interferencias. — Por el método del sobreagregado se elimina toda interferencia posible, ocasionada por sustancias extrañas al sistema, por cuanto no se introduce sustancia alguna que no esté ya presente en el sistema. Ello excluye la necesidad de considerar esos efectos y corregir los resultados.

Preparación de las muestras. — Se pesaron exactamente alrededor de 10 g de aceite lubricantes, conteniendo alrededor de 2 % de aditivo, que, puro, contiene 1,86 % de Zn y 4,71 % de Ba, se le agregaron alrededor de 0,10 g exactamente pesado de aditivo puro; a otra alícuota de la misma dilución original de aditivo en aceite, se le agregaron alrededor de 0,05 g exactamente pesados de aditivo puro.

Con fines de comprobación, se prepararon varios pares de muestras, con cantidades variables de aceite y aditivo puro.

Medida. — Llevadas las muestras a las celdas y colocadas en el espectrómetro de Rayos X, se determinaron las cuentas por minuto para el fondo y para los picos correspondientes a ambos elementos, en cada una de las muestras.

Cálculo. — Se calcula el valor de la concentración de cada uno de los elementos en la muestra original aplicando la ecuación:

$$X_1\,Co + Y_1 = (X_1 + Y_1)\,C_1 \tag{1}$$

$$X_2\,Co + Y_2 = (X_2 + Y_2)\,C_2 \tag{2}$$

en que:

X_1 y X_2: peso del aceite lubricante original con aditivo en las muestras 1 y 2 respectivamente.

Y_1 e Y_2: peso de aditivo puro, conteniendo cantidades conocidas de Zn y Ba, agregados en las muestras 1 y 2 respectivamente.

Co : concentración de Zn o Ba, en el aceite lubricante original en g/g, desconocida.

C_1 y C_2: concentraciones de Zn o Ba, resultantes en las mezclas de las muestras 1 y 2 respectivamente, en g/g.

De las ecuaciones (1) y (2) resulta:

$$C_1 = (X_1/X_1 + Y_1)\,Co + (Y_1/X_1 + Y_1) \tag{3}$$

$$C_2 = (X_2/X_2 + Y_2)\,Co + (Y_2/X_2 + Y_2) \tag{4}$$

Si para simplificar llamamos:

$$a = X_1/X_1 + Y_1 \tag{5}$$

$$b = Y_1/X_1 + Y_1 \tag{6}$$

$$c = X_2/X_2 + Y_2 \tag{7}$$

$$d = Y_2/X_2 + Y_2 \tag{8}$$

Tendremos, sustituyendo los respectivos valores en (3) y (4):

$$C_1 = a\,Co + b \tag{9}$$

$$C_2 = c\,Co + d \tag{10}$$

Sabiendo que:

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{C_1}{C_2} \tag{11}$$

En la que:

I_1 e I_2: son las intensidades (en cunetas por minuto), de las muestras 1 y 2 respectivamente.

Reemplazando, según las ecuaciones (9) y (10).

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{a\,Co + b}{c\,Co + d} \qquad (12)$$

de donde:

$$Co = \frac{d\,I_1 - bI_2}{a\,I_2 - cI_1} \qquad (13)$$

Otra alternativa es la determinación gráfica. Se preparan varias muestras con sobreagregados crecientes, por agregado de cantidades correlativamente mayores de aditivo puro, a la muestra original de aceite lubricante con aditivo. Se grafica la concentración vs. el número de cuentas por minuto, de uno de los elementos en cada uno de las muestras; la recta cortará el eje correspondiente a las intensidades en el número de cuentas que corresponde a la concentración del elemento en la muestra de aceite lubricante original; prolongando la recta en el sentido negativo del eje de concentraciones, contando de 0 al punto de corte, dará la concentración C, del elemento en la muestra de aceite lubricante con aditivo original. Figura 1.

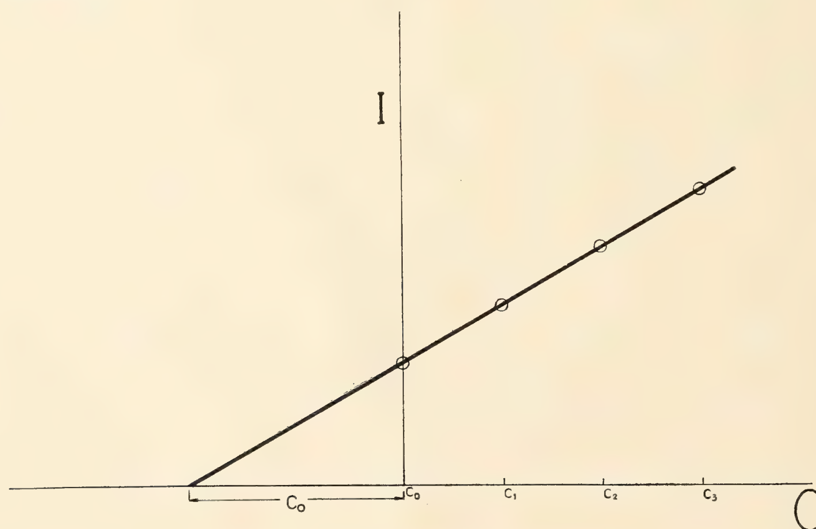


Fig. 1. — Concentración vs. intensidad

RESULTADOS

CUADRO I

Bario

Muestra	Sobreagregado conc. g/g. 10^{-4}	Conc. en el aceite lub. original con aditivo encontrada en g/g. 10^{-3}	Desviación relativa (°/₀)
1	0,75	1,21	1,2
2	1,25	1,22	0,2
3	1,61	1,23	0,8
4	2,56	1,22	0,2
5	3,35	1,23	0,8

CUADRO II

Cinc

Muestra	Sobreagregado conc. g/g. 10^{-4}	Conc. en el aceite lub. original con aditivo encontrada en g/g. 10^{-3}	Desviación relativa (°/₀)
1	0,29	0,47	0,2
2	0,49	0,48	0,8
3	0,64	0,46	1,2
4	1,01	0,47	0,2
5	1,32	0,48	0,8

La exactitud de los resultados fue comprobada a partir de las muestras sintéticas, preparadas mezclando pesos conocidos de aditivo puro, conteniendo cantidades conocidas de Zn y Ba, con aceite lubricante base, sin aditivo, graficando los resultados de intensidad vs. concentración, de modo de verificar gráficamente la corrección de los valores de C calculados.

DISCUSION

Este método tiene ventajas frente a otros descriptos para el análisis de Zn y Ba en aceites lubricantes.

No se agregan sustancias que no estén presentes ya en el sistema original; es decir, la matriz no cambia.

La desviación relativa es menor a la que se logra por otros métodos.

El tiempo que demanda la determinación es muy breve, menos de media hora.

Para una determinación de rutina sólo es necesario preparar dos muestras con sobreagregado.

La concentración de los elementos en la muestra original, puede determinarse por resolución gráfica o analítica.

REFERENCIAS

1. Davis, E. N., y Van Nordstrand, R. A. Anal. Chem., 1954, 26, 973.
2. Haycock, R. F., J. Inst. Petrol. 1964, 50, 123.
3. Jenkins, R. y de Vries, J. L. *Practical X-Ray Spectrometry* Eindhoven, The Netherlands, Philips Technical Library 1967.

ANALES DE LA COMISION DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

NUEVAS ACOTACIONES SOBRE PULPOS COSTEROS

Por ZULMA J. A. de CASTELLANOS

RESUMEN

En este trabajo se proporcionan nuevos caracteres diferenciales entre *O. tehuelchus* y *O. lobensis*, entre ellos figuran: diferencias peniales, elementos sexuales y caracteres cromatoforales; además se dan a conocer algunos aspectos de las crías de *O. tehuelchus*.

ABSTRACT

In this paper new differential characteristics beetwen *O. tehuelchus* and *O. lobensis* are compared; among them are characteristics of the penis, Needham's sac, spermatophores, chromatophores, etc. Also first record of some aspects of eggs and embryos of *O. tehuelchus* to be taken in shallow waters, are given.

Cuando se dio a conocer la nueva especie de pulpo costero *O. lobensis* Castellanos-Menni 1969, afirmamos que, sin lugar a dudas, era *O. tehuelchus* D'Orb. la especie más afín. Actualmente hemos revisado una nutrida colección de ambas especies, con la finalidad de abundar en detalles que ayuden a la diferenciación específica, expuesta anteriormente.

Así, de la colección del Museo La Plata hemos revisado los siguientes lotes, a saber:

n° 2073 Puerto Lobos, col. Biraben-Hilton Scott 5/II/38.
n° 2087 Puerto Lobos, col. Biraben-Hilton Scott 7/II/38.
n° 2075, 2086, 2088, 2092 Puerto Lobos, col. Biraben-Hilton 1938.
n° 70003 Mar del Plata, col. Boschi II/62.

nº 2083 Puerto Quequén, col. Biraben-Hilton Scott I/62.
nº 2085 Mar del Plata, col. Dautert 1929.
nº 2076 Miramar, col. Dautert 1929.
s/n Bahía Craker, col. M. Vucetich 7/1968.

De la colección del Museo Argentina Bernardino Rivadavia, he revisado, material procedente de:

nº 20287 Bahía San Blas, col. "San Luis" A.R.A.
nº 21232 Golfo San Matías.
nº 24523 Golfo San José.
nº 18387 Lat/40° S. Long. 62° W.
nº 414 Puerto Quequén.
nº 15575, 19585 Necochea.

Habíamos afirmado que el aparato genital no ofrecía diferencias de importancia, no debiéndoles darse mayor valor al color blanco lechoso de los órganos masculinos de *O. tehuelchus* frente al blanco amarillento de *O. lobensis*. A lo sumo examinando exhaustivamente caracteres peniales, hallamos en *O. tehuelchus*, el penis más globoso y partiendo de la porción media del mismo, el saco de Needham es acodado casi en ángulo recto, terminando en su extremo distal en aguda punta. La glándula prostática anexa es suavemente contorneada y gruesa, presentando en la entrada al saco de Needhan una suave depresión en la zona donde se le adosa la glándula espermática. El testículo redondeado mide 15 mm de diámetro (fig. 13).

La hembra presenta el ovario de 25 × 15 mm y oviductos laterales de 21 × 2,2 mm conteniendo unos 90 óvulos en maduración, color amarillo fuerte, suavemente curvados de 7 a 10 mm y presentando a lo largo 8 a 10 cóstulas blanquecinas, juntamente con otros tantos (90) óvulos inmaduros en tamaño decreciente. Algunos ejemplares presentaban glándulas oviductales acrecentadas y oscuras.

En *O. lobensis*, el penis del macho es ligeramente menos globoso, llevando sobre el dorso una suave depresión. La bolsa de Needham o saco espermatoforal, presenta un codo en ángulo más agudo, mientras la glándula espermática anexa puede presentar un ansa dorsal más acentuada que en la especie anteriormente citada (aunque este carácter no es constante). El resto es similar a *O. tehuelchus* (fig. 12).



Fig. 1. — *Adelomedon beckii* con puesta de *O. tehuelchus.*

El ovario en *O. lobensis* es de 18 × 10,5 mm y no indica alternativas diferentes respecto a *O. tehuelchus*. Las hembras que fueron colectadas en el mes de febrero muestran sus óvulos inmaduros



Fig. 2. — Huevos no fecundados y huevos embrionados y joven cría fuera de envoltura de *Octopus tehuelchus* × 2,5

(lo cual no es extraño, para la fecha de recolección) o bien óvulos hasta 9 mm de largo, color blanco amarillento y sin notables cóstulas aún. Las glándulas oviductales son menos pronunciadas y los oviductos de 18 × 2 mm. Podemos afirmar que son hembras que no están en la plenitud de madurez sexual.

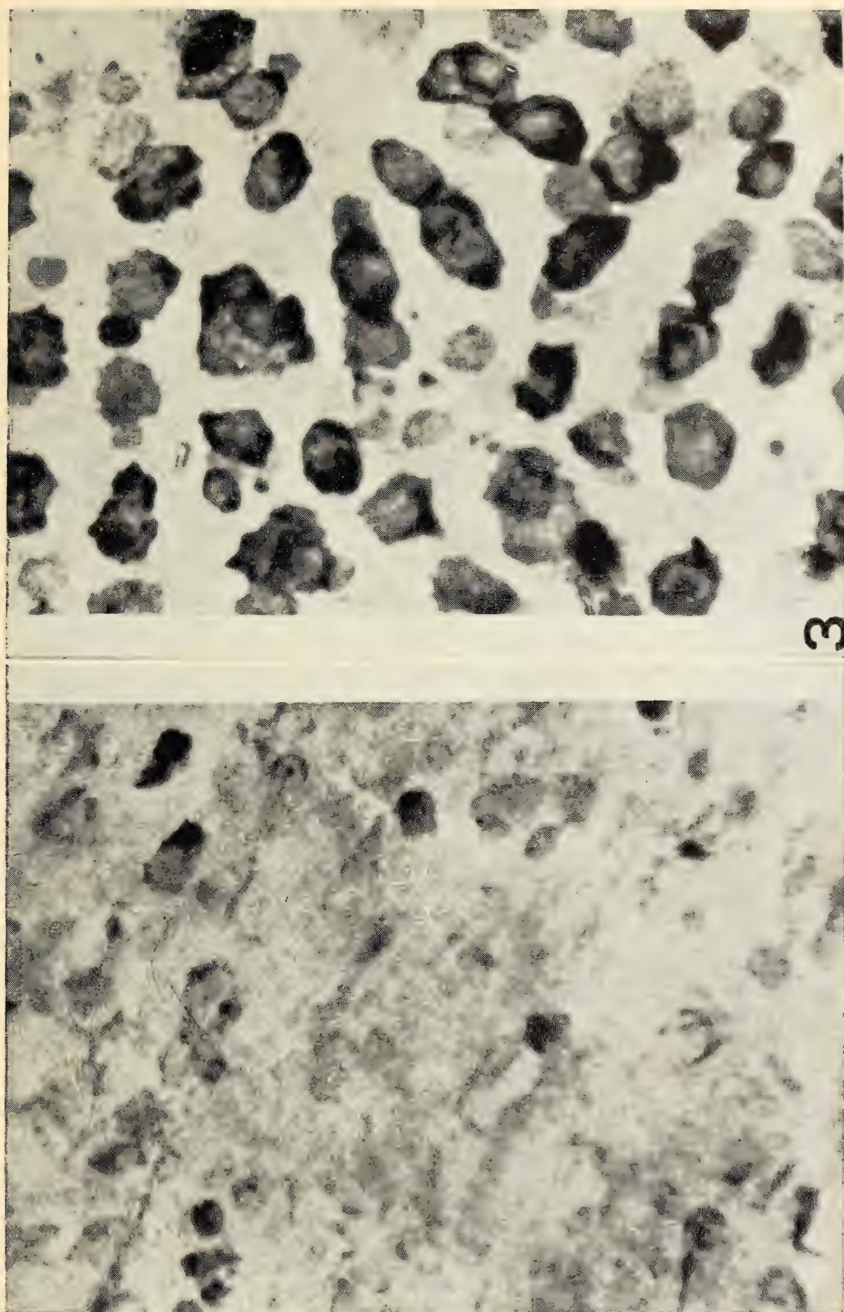


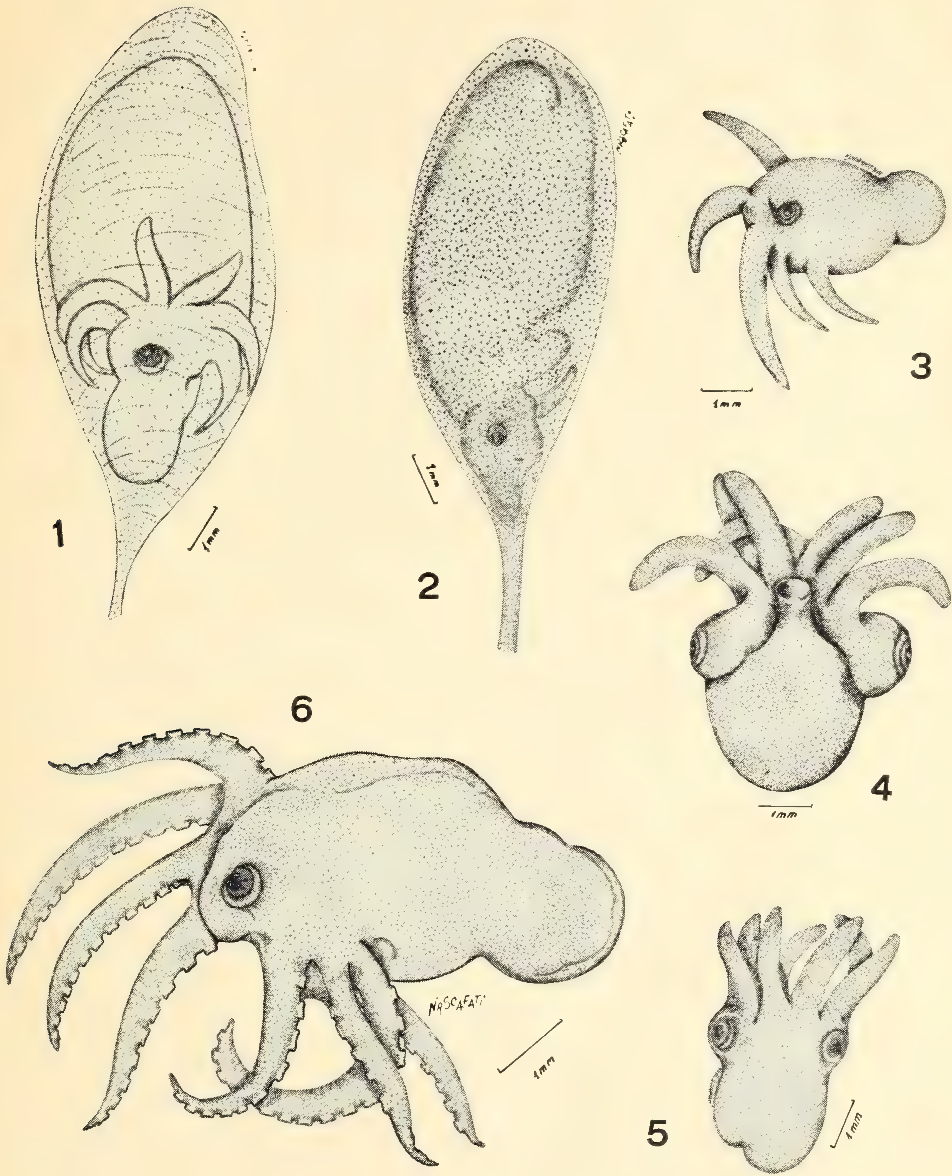
Fig. 3. — Aspecto de los cromatóforos en ambas especies, a la izquierda *Octopus tehuelchus*, a la derecha *O. lobensis*

El espermatóforo, es una de las estructuras que señalan, a nuestro criterio, detalles dignos de tenerse en cuenta. La porción proximal del reservorio espermático, en un espermatóforo ya formado, lleva en *O. tehuelchus* entre 30 a 33 vueltas de la masa espermática, midiendo ese intervalo 12 a 14 mm. La porción mediana y separatriz con el ducto eyaculatorio observa la forma de un tapón oval cuadrangular pequeño. El extremo distal eyaculador, denota una sola constricción en el primer tercio y escaso número de ondulaciones del ducto. El tamaño de esta zona mide 13 a 15 mm. Tamaño total del espermatóforo 30 mm (fig. 8 y 10).

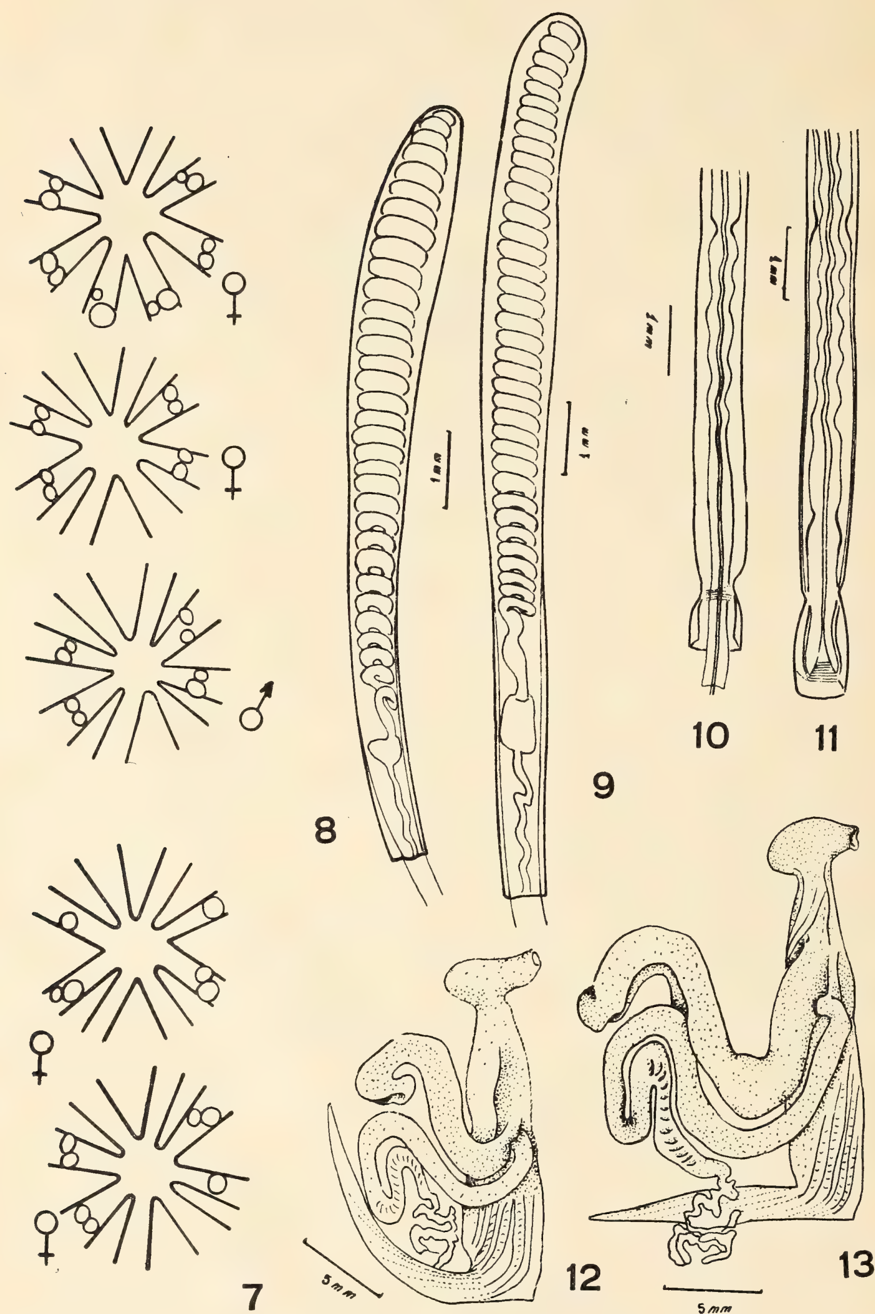
En *O. lobensis* la parte basal del saco espermático mide 13 mm y lleva 37 vueltas o giros de la masa espermática y el tapón o válvula, en un espermatóforo al término de su formación (que fue difícil de ubicar, dada la época de recolección) tiene la forma de un cono truncado. La zona distal eyaculadora presenta dos contricciones en el primer tercio y un mayor número de ondulaciones del ducto. Largo total del espermatóforo es de 32 mm (fig. 9 y 11).

Material cedido gentilmente por la alumna Sta. Ripa Alsina, colectados en Mar de Ajó en julio de 1969 y otro de la colección Museo de La Plata, nos ha permitido observar huevos embrionados de *O tehuelchus*, conteniendo distintos estadios de cría. En ambos casos la puesta aparece depositada sobre *Adelomedon brasiliana* y *Adelomedon beckii* respectivamente, cuyas conchillas muy desgastadas y destruidas, de las cuales se representa en fig. Nº 1) del texto, una valva con evidente invasión de la esponja perforante *Cliona celata*, además de habitáculos de *Spirorbidae*, aunque el receptáculo de la cría puede ser otro tipo de caracol o almeja. Carcelles ha citado (1944) y fotografiado cría de *O. tehuelchus* sobre una valva de *Protothaca antiqua*, agregando algunos datos sobre su aspecto.

El tamaño de los huevos es muy homogéneo, aproximadamente de unos 15 mm de largo total incluyendo el fuerte pedículo cementado a la conchilla receptora. En el caso ilustrado de *Adelomedon beckii* la puesta comprende unos 80 huevos. Los embriones en distintos estados de evolución han sido representados y fotografiados. El saco vitelino ocupa una gran parte de los huevos y el mayor embrión hallado mide 8,5 mm. Lleva 8 brazos subiguales sin membranas interbraquiales evidentes, de color blanquecino, sin trazas de cromatóforos. La posición de los prominentes ojos denota



Lám. I. — 1, Detalle de huevo embrionado ; 2, Detalle de huevo embrionado menos adelantado ; 3, 5, Vista lateral y dorsal de embrión joven ; 4, Vista ventral de embrión más adelantado que 3, 5 ; 6, Tamaño mayor de la cría examinada.



Lám. II. — 7, Esquema de la disposición de las ventosas del 6º y 7º par en *C. tehuelchus* ; 8, Parte basal del espermatóforo de *O. tehuelchus* ; 9, Parte basal del espermatóforo de *O. lobensis* ; 10, Parte distal del espermatóforo de *O. tehuelchus* ; 11, Parte distal del espermatóforo de *O. lobensis* ; 12, Genital masculino de *O. lobensis* ; 13, Genital masculino de *O. tehuelchus*.

una leve asimetría. Alrededor de un blanco cristalino se observa un aro rosado y más externamente otro de un violáceo intenso.

Largo del manto desde los ojos es de 3,5 mm.

Largo de la umbrela 1 mm.

Largo de los brazos 4 mm.

En todos los estadíos observados, el embrión ocupaba la parte basal del huevo, llevando los tentáculos en contacto con la masa vitelina en estadíos avanzados, próximos a la eclosión. La cápsula o cubierta es muy resistente.

El tipo de huevo de *O. tehuelchus* por el gran tamaño, además de la escasa numerosidad de la puesta, corresponde a lo que Voss y Solís citan para *O. briareus* y *O. joubini*, donde los pulpitos llevan de inmediato vida bentónica. El caso opuesto corresponde a *O. vulgaris* que depone huevos pequeños y numerosos, llevando una temporaria vida planctónica.

Por último, hemos representado (fig. 7) otros caracteres diferenciales del adulto, anotados oportunamente. Nos referimos a la tendencia de *O. tehuelchus* al agrandamiento del sexto o séptimo par de ventosas, existiendo evidentemente una inclinación a que ello suceda en los pares laterales de los brazos de machos y hembras, con mayor frecuencia.

En su oportunidad, destacamos diferencias macroscópicas en la textura de la piel, agregando ahora diferencias en el tinte y conformación de los cromatóforos y en la convicción que las fotografías dadas son más elocuentes que las descripciones, solamente señalamos que el tinte en *O. tehuelchus* es castaño claro violáceo y los cromatóforos de borde difuso, en tanto en *O. lobensis* son de contorno neto y el pigmento castaño oscuro violáceo.

BIBLIOGRAFIA

Batham, E. J. 1957. Care of eggs by *O. macropus*. *Trans. Roy. Soc. N. Z.* 84, 629-638.

Burguess, L. A. 1966. A study of the morphology and biology of *O. hummelincki* Adam.. *Bull. Mar. Sci.* 16 (4) : 762-813.

Carcelles, A. 1944. Catálogo de los moluscos marinos de Puerto Quequén. *Rev. Mus. La Plata N. S. Zool.* III, lám. 15 : 233.

Castellanos, Z. A. y Menni, R. 1969. Sobre dos pulpos costeros de la Argentina. *Neotropica* 15 (47).

Fuentes, D., Solís, R. de la Garza, J. 1965. Algunos aspectos de la reproducción del pulpo *O. vulgaris* de la Sonda de Campeche. *Cont. I. Nac. Inv. Biol. Pesq. al II Congreso Ocean. Ensenada* B. C. : 1-9.

Portmann, A. 1932. Observations sue la vie embrionnaire de la pieuvre *O. vulgaris., Arch. Zool. Exp. Gen. Notes.*, 8 *Rev.* 76 (1) : 24.

Rees, W. J. 1956. The larvae and late-larvae stages of *O. macropus. Proc. Malac. Soc. London* 31 : 185-189, pls. 9-10.

Robson, G. C. 1932. Notes on the Cephalopods nº 16. On the variation eggs and ovipository habits of Florida octopods. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 10 (10) : 368-374.

Solis Ramírez, M. 1967. Incubación parcial de *O. maya* en laboratorio. *III Congreso de Oceanog. de Campeche*, Méjico.

— 1967. Aspectos biológicos del pulpo *O. maya. Inst. Nac. Invest. Biol. Pesq.* nº 8, Méjico.

LA BIOSINTESIS DE LA CELULOSA SEGUN INVESTIGACIONES CINETICAS

Por MARIANA MARX de FIGINI

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Uebersicht gegeben über kinetische Untersuchungen zur Biosynthese der Cellulose aus den Samenhaaren der Baumwolle bzw. aus der Alge Valonia. Die Ergebnisse zeigen, dass die Synthese der Sekundärwandcellulose nach einem strukturgeregelten Mechanismus (Matrizenmechanismus) verläuft und dass somit der Polimerisationsgrad der Cellulose einer genetischen Kontrolle unterliegt.

Es werden ferner enzymatischer Mechanismus, Ort der Synthese und Zusammenhang zwischen Synthese der Cellulosemoleküle und fibrillärer Ablagerung diskutiert.

INTRODUCCION

En los últimos años se ha trabajado intensamente sobre el mecanismo de formación de proteínas. En comparación con la biosíntesis de las proteínas, la biosíntesis de la celulosa, cuya estructura química es más simple, atrajo mucho menos la atención de los investigadores, a pesar de su gran importancia como material principal de las paredes de las células vegetales. En este artículo se mostrará que también la biosíntesis de las moléculas de la celulosa ocurre a través de un control genético, es decir, que existe una analogía más grande con el mecanismo biosintético de las proteínas, que la generalmente se ha supuesto.

Investigaciones sobre la biosíntesis de la celulosa pueden ser realizadas bajo tres distintos puntos de vista:

1º ensayos sobre el metabolismo bioquímico de la glucosa antes y durante su polimerización dando celulosa.

2º ensayos cinéticos sobre el mecanismo de la reacción de polimerización.
3º estudios sobre la deposición fibrilar de la celulosa y su orientación así como sobre la estructura fina del citoplasma durante la síntesis, por medio de microscopía electrónica.

Dentro de estos tres caminos las investigaciones cinéticas son especialmente apropiadas para obtener precisas informaciones sobre el mecanismo del proceso de formación de las macromoléculas celulósicas.

Generalmente se pueden discutir para el proceso de policondensación de glucosa en celulosa tres distintos mecanismos de reacción:

a) una policondensación estadística, en que las unidades monoméricas se agregan entre sí estadísticamente.
b) una policondensación según un mecanismo con "prímeros" (iniciadores) como material de partida. En este proceso todos los monómeros activados tienen la misma probabilidad de agregarse a la cadena creciente, y el tiempo entre comienzo y fin de la policondensación es el mismo para todas las moléculas poliméricas.
c) una policondensación, que está controlada por una estructura. Es decir, la policondensación ocurre a lo largo de una estructura que funciona como molde (matriz) y que determina el número de los monómeros combinados en una macromolécula.

Estos tres mecanismos se distinguen en su cinética de reacción. En el caso de una policondensación estadística sólo conversiones por encima de 99 % conducen a la formación de macromoléculas. La distribución del peso molecular que resulta corresponde a la así llamada "distribución más probable". En el caso de una policondensación según un mecanismo de Poisson el grado de polimerización aumenta proporcionalmente a la conversión. Modificaciones de las condiciones de reacción cambian la velocidad de reacción y simultáneamente el grado de polimerización. Las curvas de distribución del grado de polimerización son muy estrechas. Un mecanismo del tipo *c)* se caracteriza por una falta de relación entre grado de polimerización y conversión, contrariamente a los casos *a)* y *b)*. El grado de polimerización resulta el mismo, independiente tanto

de la conversión como de las condiciones de reacción, siendo la distribución resultante completamente uniforme.

Se desprende pues de lo expuesto que la investigación de la cinética de la biosíntesis de la celulosa, y conjuntamente la medición de la distribución del grado de polimerización, ofrece la posibilidad de determinar el mecanismo según el cual toma lugar la biosíntesis de la celulosa.

En lo que sigue se dará un resumen de los resultados obtenidos por las investigaciones cinéticas, discutiéndolos conjuntamente con recientes resultados de microscopía electrónica, que permitirá exponer un resumen sobre los conocimientos actuales de los procesos celulares que toman parte en la formación de la celulosa de la pared vegetal.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales adecuados para efectuar investigaciones cinéticas son las fibras de las semillas del algodón como representante de las plantas superiores y del alga Valonia como representante de las plantas inferiores. En el caso del algodón, se puede determinar con mucha exactitud el tiempo de la síntesis, fecundando las flores artificialmente y cosechando las cápsulas en maduración a tiempos determinados. Se considera el día de la fecundación como punto de partida de la síntesis de la celulosa. En el caso del alga Valonia la velocidad de la biosíntesis de la celulosa es demasiado baja para realizar experimentos cinéticos. Pero existe la posibilidad de investigar con suficiente precisión la relación entre el grado de polimerización y la cantidad de celulosa sintetizada, así como la distribución del grado de polimerización.

Una condición absolutamente necesaria para las investigaciones cinéticas es la completa aislación de la celulosa de las células vegetales sin ningún cambio de sus propiedades moleculares nativas, es decir sin degradación de su grado de polimerización nativo y sin cambio de su estructura química. Los métodos desarrollados para cumplir esa condición fueron puestos a punto antes de aplicarlos a las investigaciones cinéticas. Todos los métodos usados están descriptos en detalle en otro lugar (1).

Las determinaciones del Indice de Viscosidad $[\eta]$ ("Indice de Staudinger") y del grado de polimerización $\overline{P_w}$ (valor promedio del peso) fueron efectuadas en soluciones de complejo cuproetilene-

diamínico ("Cuen") [2] y en el caso de los nitratos de la celulosa en acetona, usando "condiciones estandarizadas" [3, 4].

Las curvas de distribución del grado de polimerización fueron obtenidas por medio de fraccionamientos por precipitación según un método establecido especialmente para celulosa, mejor dicho para sus nitratos [5-7].

RESULTADOS EXPERIMENTALES

La primera figura muestra la curva cinética junto con la correspondiente relación entre el grado de polimerización $\overline{P_w}$ y tiempo de síntesis. Esos resultados corresponden a una serie de ensayos usando las fibras de semilla de algodón. Curvas equivalentes resultaron en cada una de todas las series investigadas [8, 1, 9]. Dado que el número de las semillas por cápsula es variable, la conversión (es decir la cantidad de celulosa sintetizada en un tiempo determinado), está dada en mg de celulosa por semilla.

Considerando primero la curva cinética, se ve que la biosíntesis de la celulosa comprende dos períodos distintos. Al principio hay un período lento, en él se forma solamente poca celulosa. El subsiguiente período tiene una velocidad mucho más grande y constante durante toda la maduración. Es decir se trata de una reacción de orden cero. En este período se sintetiza prácticamente toda la masa celulósica. Como se ha probado y descripto en otro lugar [1, 9], se puede identificar estos dos períodos con la formación de las dos distintas láminas morfológicas, llamadas "pared primaria" y "pared secundaria" en la célula vegetal. Los dos períodos se distinguen también en el comportamiento del grado de polimerización, el cual aumenta durante la formación de la pared primaria y queda constante durante toda la síntesis de la pared secundaria, teniendo un valor de $\overline{P_w} \approx 13000$. Este resultado ya indica que la síntesis de la pared secundaria forma moléculas idénticas con respecto a su grado de polimerización.

El $\overline{P_w}$ permanece constante aun modificando la velocidad de la síntesis, como está demostrado en la figura 2. Aquí están representadas las mismas relaciones que en la figura 1 para distintas velocidades de reacción. Estas fueron obtenidas variando la intensidad lumínica bajo las cuales ocurrió la maduración de las cápsulas [10].

Se ve que el grado de polimerización de la celulosa de la pared secundaria es completamente independiente de la conversión y de la velocidad de la reacción. La figura 2 muestra además, que distintas especies de algodón dan el mismo resultado.

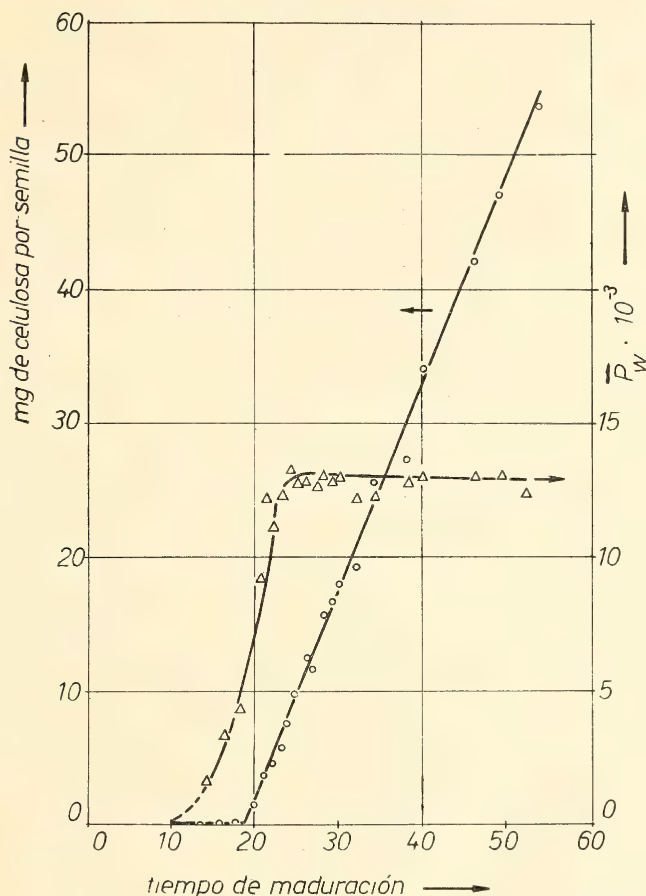


Fig. 1. — Conversión en mg de celulosa por semilla y el correspondiente grado de polimerización $\overline{P}_W$ en función del tiempo de sintesis. Celulosa de algodón (gossypium herbaceum).

La independencia del $\overline{P}_W$ de la conversión y de las condiciones de la reacción se puede ver más claro en la figura 3, donde está representado el $\overline{P}_W$ en función de la conversión para distintas series de investigación, realizadas bajo distintas condiciones y con distintas especies de algodón.

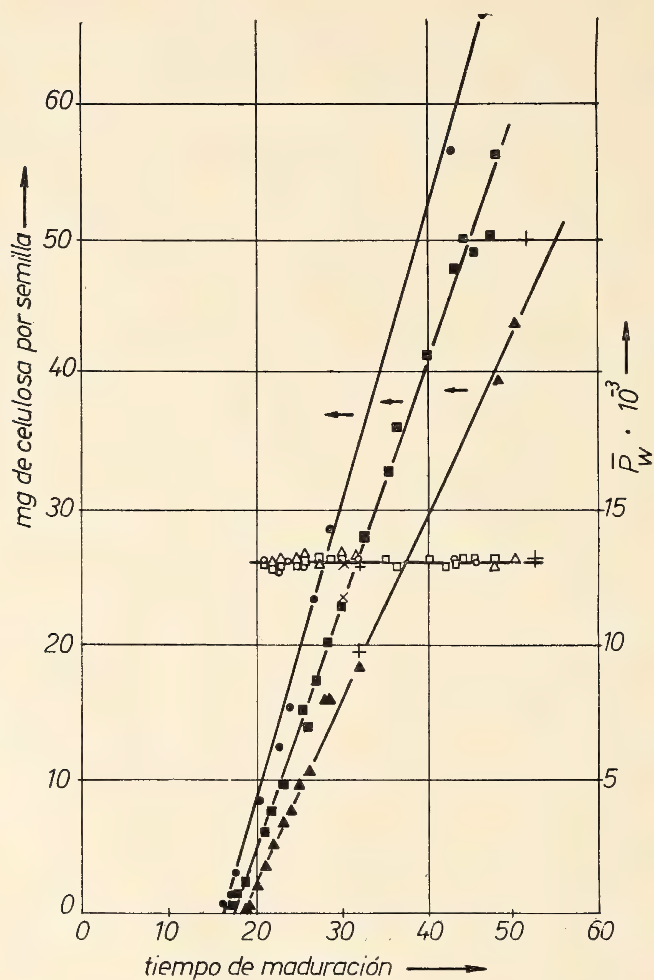


Fig. 2. — Conversión en mg de celulosa por semilla y el correspondiente grado de polimerización $\overline{P_W}$ en función del tiempo de sintesis bajo distintas condiciones de reacción. (gossypium herbaceum y gossypium hirsutum) 60 000 Lux, 15000 Lux, 4000 Lux.

Una dependencia del grado de polimerización de la conversión ocurre solamente durante el primer período y desaparece completamente con el comienzo de la síntesis de la pared secundaria.

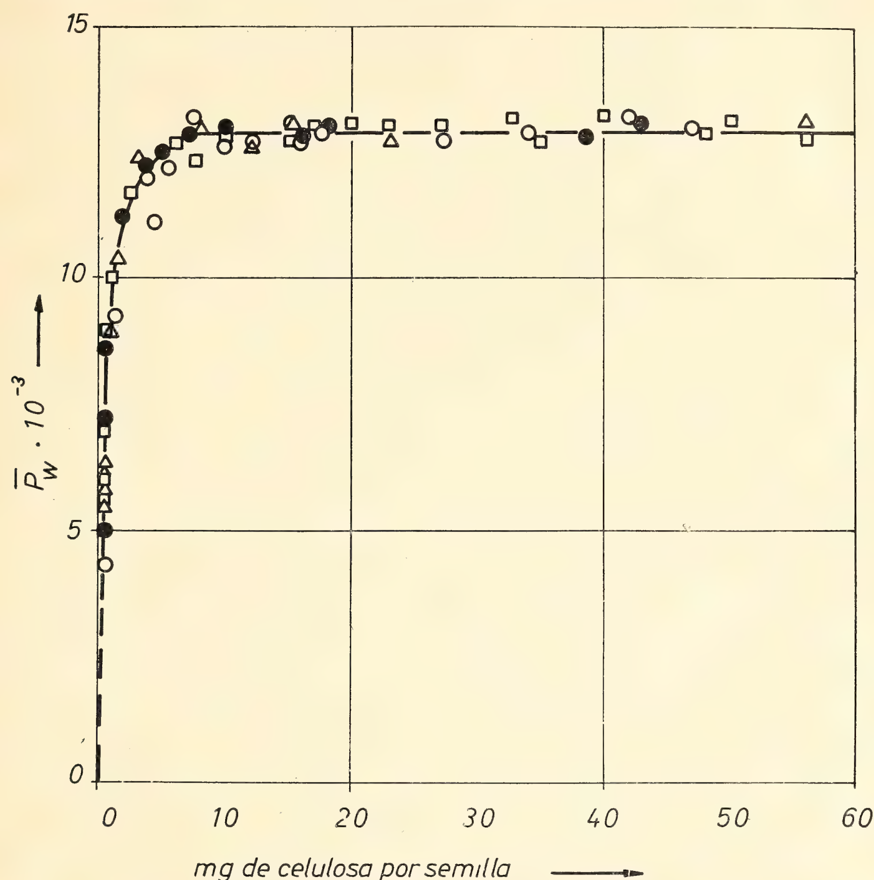


Fig. 3. — Grado de polimerización $\overline{P}_W$ en función de la conversión para cuatros series de investigaciones realizadas bajo distintas condiciones de reacción. (gossypium herbaceum y gossypium hirsutum).

El mismo resultado fue obtenido por las investigaciones sobre el alga Valonia ([11]), como se puede ver en la figura 4. Aquí está representado el $\overline{P}_W$ en función de la cantidad de celulosa sintetizada por cada célula.

Como se trata de algas de distintos orígenes, se puede decir que el grado de polimerización es independiente no solamente de la conversión sino también de las condiciones de la síntesis. Es decir,

que la biosíntesis de la celulosa en las plantas inferiores debe obedecer al mismo mecanismo que en las plantas superiores. La única diferencia existente es el valor numérico del $\overline{P}_w$ que es superior en el alga.

La existencia de las dos celulosas, es decir la celulosa de la pared primaria y la de la pared secundaria, así como la homogeneidad

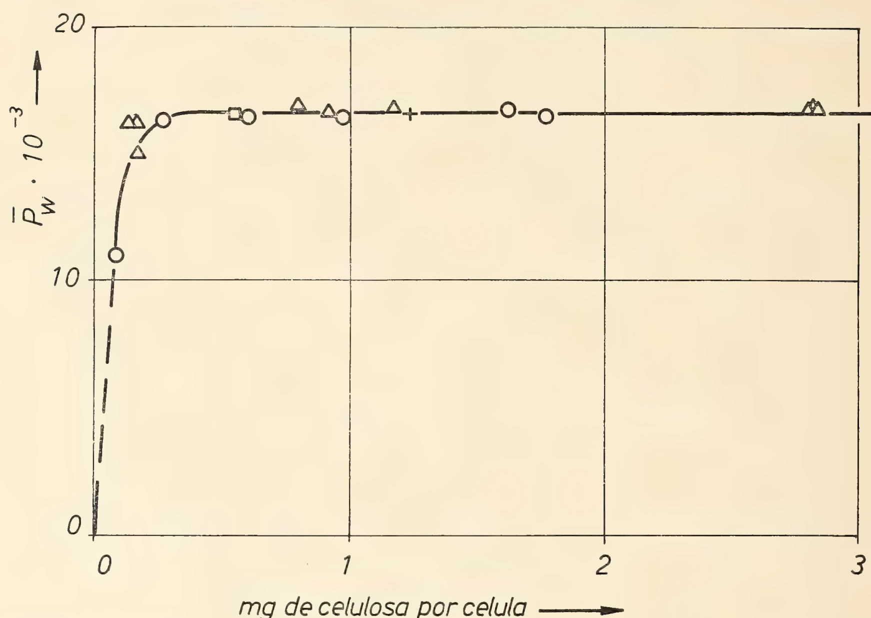


Fig. 4. — Grado de Polimerización en función de la conversión en mg celulosa por célula para el alga Valonia de distintos orígenes. Naples, cultivadas en Maguncia, Yugoslavia, cultivadas en Helgoland.

molecular de la celulosa secundaria se ha podido confirmar por medio de la determinación de la distribución del grado de polimerización ([10, 7, 13]). Las figuras 5 a - 5 c muestran las curvas de distribución de la celulosa de algodón con conversiones de 2, 20 y 100 %. Aquella de 2 % de conversión corresponde exactamente al comienzo de la síntesis de la celulosa secundaria.

Las curvas de distribución obtenidas son bimodales. El máximo pequeño de cada figura corresponde a la celulosa primaria, en tanto que los máximos principales al extremo de altos pesos moleculares de las curvas representan la celulosa secundaria. Estos máximos son extremadamente estrechos, lo que significa una uniformidad extraordinaria de ese material. Dado que el margen de error

del fraccionamiento es mayor que el ancho ocasionado por la homogeneidad propia de esos máximos, se puede suponer para la celulosa secundaria una completa uniformidad. Igualmente importante

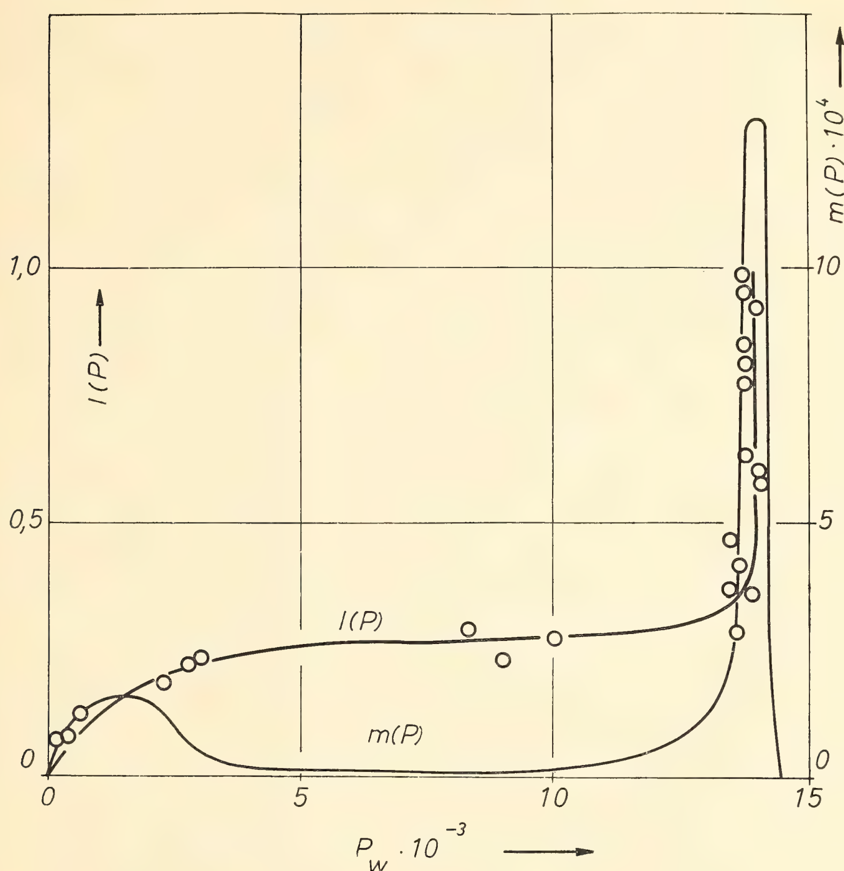


Fig. 5*a*. — Curvas de distribución del grado de polimerización P_W. (I(P) = curva integral m(P)= curva diferencial, para celulosa de algodón a una conversión de 2 %

es, que la posición de esos máximos a $P_W \approx$ 14000 no cambia con la conversión, solamente su porcentaje de masa aumenta en tanto que la masa correspondiente al máximo primario disminuye.

La misma característica muestra la curva de distribución del alga Valonia en la figura 6. El máximo principal está en este caso cerca del $P_W \approx$ 19000 de acuerdo al mayor valor promedio de $\overline{P_W}$.

Contrariamente a la homogeneidad de la celulosa sintetizada en el segundo período de síntesis, la celulosa producida en el primer período se caracteriza por tener una distribución más ancha, no

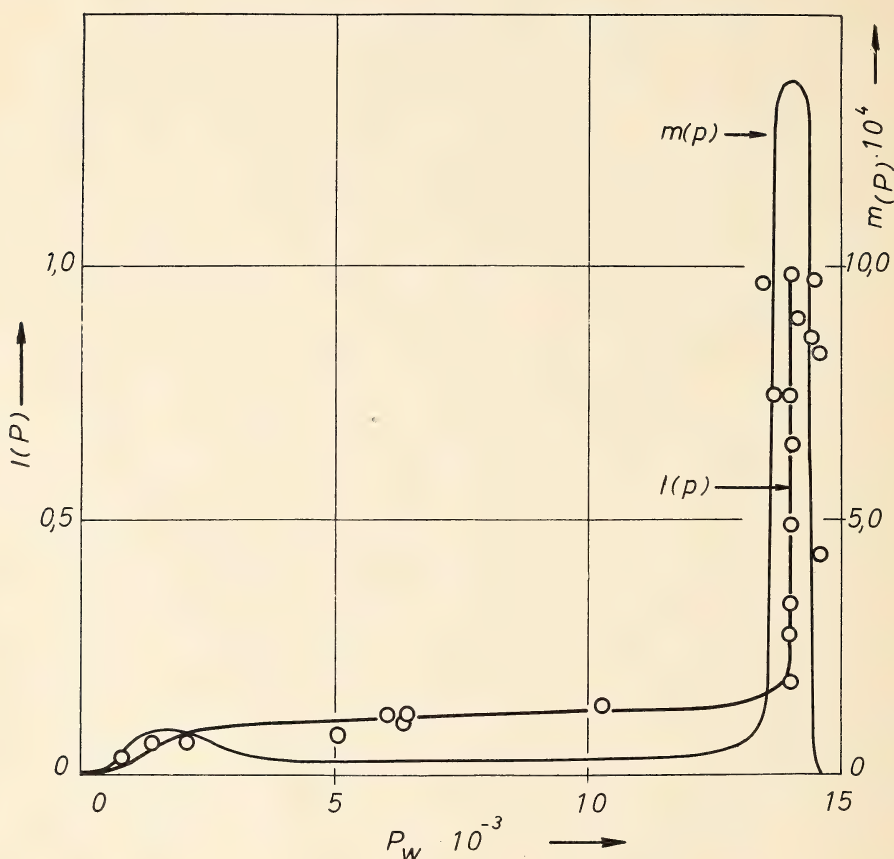


Fig. 5*b*. — Curvas de distribución del grado de polimerización P_W. (I(P) =curva integral m(P) = curva diferencial, para celulosa de algodón a una conversión de 20 %

conteniendo material de $P_W \approx 14000$, como está demostrado en figura 7.

Investigaciones preliminares sobre el promedio del grado de polimerización y su distribución en otras plantas superiores como ramio, lino y maderas indicaron valores y características muy similares a los aquí referidos [6, 14]. Por eso se puede suponer, que también la cinética de la biosíntesis de la celulosa de esas plantas

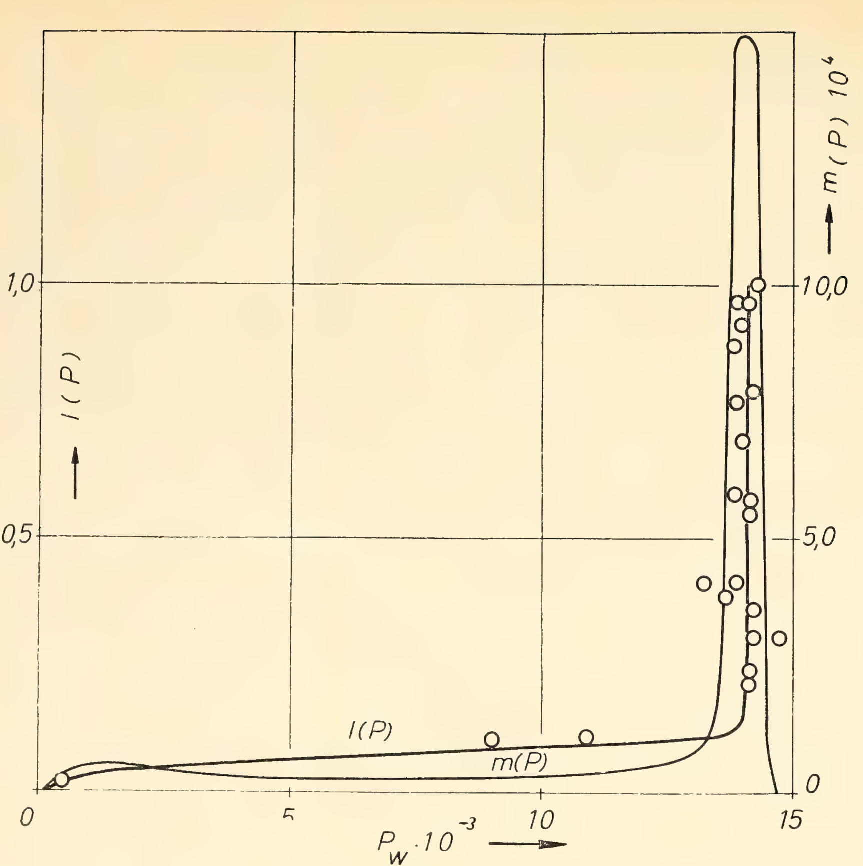


Fig. 5c. — Curvas de distribución del grado de polimerización P_w. (I(P) = curva integral m(P) = curva diferencial, para celulosa de algodón a una conversión de 100 %

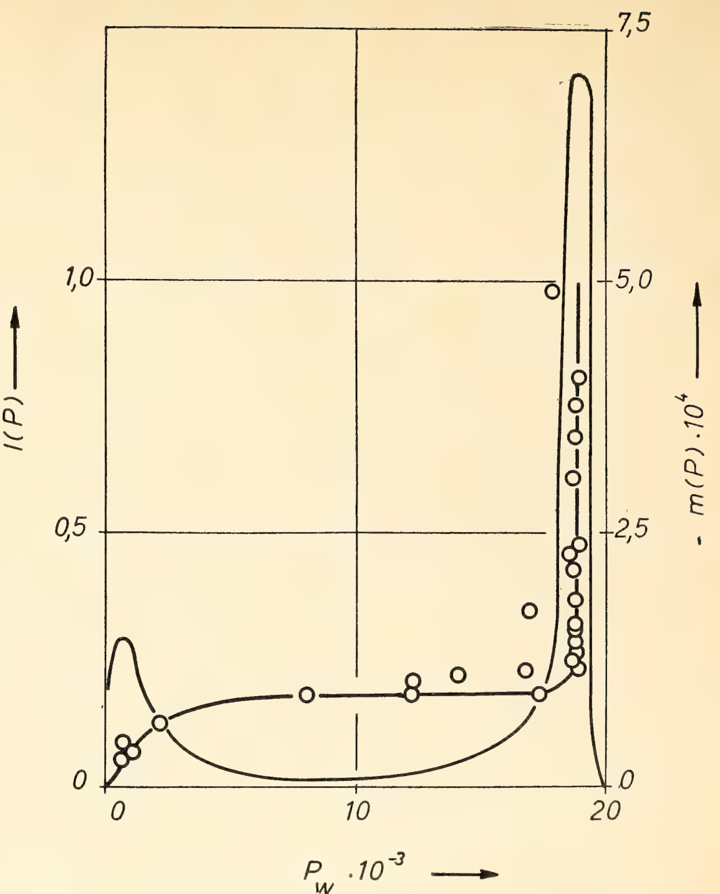


Fig. 6. — Curvas de distribución del grado de polimerización P_w. (I(P)=curva integral m(P) = curva diferencial, para celulosa del alga Valonia a una conversión de 35 %.

corresponde al mismo tipo. Así se puede considerar que los resultados alcanzados con algodón y valonia valen para todas las plantas superiores y, con respecto a las plantas inferiores, al menos para las algas.

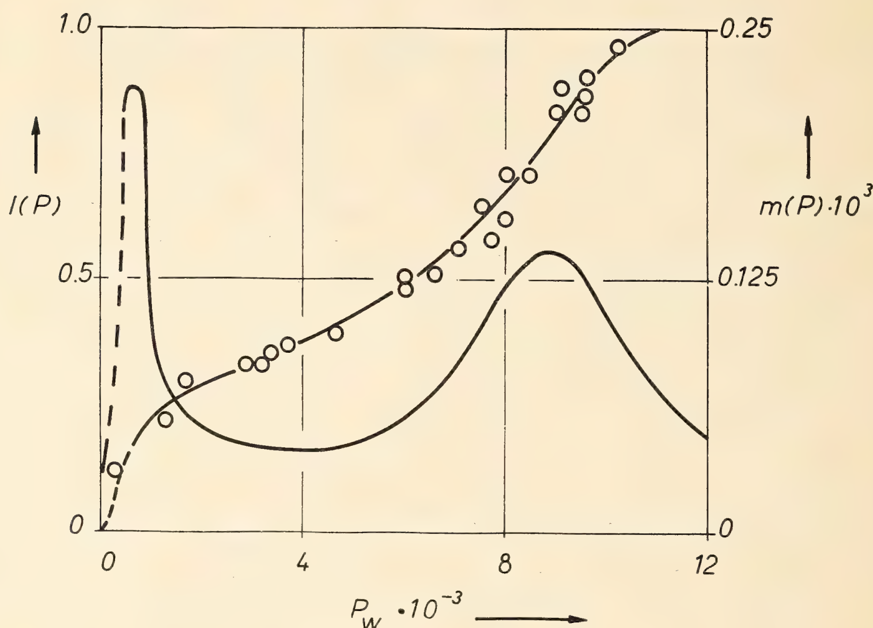


Fig. 7. — Curvas de distribución del grado de polimerización para celulosa de la pared primaria (celulosa de algodón) a una conversión de 0,2 %

DISCUSION

Los resultados más notables de las investigaciones cinéticas son la completa homogeneidad del peso molecular y su considerable independencia de la conversión, de la velocidad y de las condiciones de reacción, ocurriendo durante la síntesis de la celulosa de la pared secundaria. Recordando los tres mecanismos posibles considerados en la introducción, los resultados experimentales pueden ser interpretados solamente con el mecanismo *c*). Es decir, la parte principal de la celulosa está sintetizada por un mecanismo que fundamentalmente está regido por una estructura matriz, la cual determina que el número de unidades glucosídicas combinadas por molécula de celulosa resulte siempre el mismo. Así pues a través

del control genético del peso molecular de la celulosa secundaria, la célula vegetal puede sintentizar este polisacárido siempre con las mismas propiedades moleculares independientemente de las condiciones bajo las cuales se realiza esa síntesis.

Esto no parece ser el caso de la síntesis de la celulosa de la pared primaria, porque su valor promedio del grado de polimerización depende de las condiciones de la reacción y su distribución es más ancha. Por eso se puede suponer que la celulosa de la pared primaria y la de la pared secundaria están sintetizadas por mecanismos distintos.

La existencia de estos dos mecanismos diferentes se ve corroborada por resultados experimentales sobre la síntesis *in vitro* enzimática de la celulosa ([16]). Según estos experimentos las enzimas aisladas de cápsulas de algodón con tiempos de maduración mayor de veinte días (es decir, cuando comienza la síntesis de la celulosa secundaria) no retenían su capacidad para sintetizar celulosa a partir de GDP-glucosa ([17]). Paralelamente con esa pérdida de actividad enzimática frente a la GDP-glucosa el complejo enzimático deviene activo sintetizando celulosa a partir de UDP-glucosa ([18]). Aparentemente en los dos mecanismos arriba mencionados participan diferentes enzimas, las cuales necesitan distintas clases de glucosa activada. Posiblemente la "estructura de control" que guía la síntesis de la celulosa secundaria reacciona preferentemente con UDP-glucosa para formar el complejo "matriz-substrato-enzima" responsable del agregado de glucosa en la cadena celulósica.

La naturaleza química de la "estructura matriz" así como la organela que colabora en la formación de la celulosa son todavía desconocidas. Según el grado de polimerización de $P_w \approx 14000$ de las moléculas celulósicas, la "estructura" y también la organela deben tener aproximadamente 7 μ de largo. Además del plasmalema solamente los "microtúbulos" pueden alcanzar tal longitud. Observaciones hechas con el microscopio electrónico permitieron suponer que los microtúbulos podrían ser el lugar de la síntesis de la celulosa ([19-22]), conteniendo también la matriz informativa. No obstante, cuando la síntesis de celulosa se realiza en presencia de colchicina, que es conocida por su acción destructora de los microtúbulos, ni la conversión, ni el grado de polimerización ([23]), ni la orientación de la fibrilas resultan modificadas ([24]). Este resultado, pues, indica que el plasmalema y no los microtúbulos puede ser el lugar

de síntesis de la celulosa. Recientes investigaciones con microscopía electrónica ([25-27]) y sedimentación ([28]) parecen favorecer esta suposición, aun sin responder a la pregunta sobre la naturaleza química de la "estructura matriz". Investigaciones preliminares con actinomicina demostraron un aumento de la cantidad de la celulosa sintetizada, pero ningún efecto sobre el grado de polimerización ([29]). Según este resultado, la actinomicina aparentemente no bloquea la formación de la estructura matriz, pero sí la formación de un inhibidor de la síntesis (quizás de una enzima que destruye la "sintetasa" de la celulosa).

La completa uniformidad en la longitud de la cadena de las moléculas plantea la pregunta, si la morfología supermolecular y la estructura cristalina de la celulosa estarían gobernadas también por el proceso biosintético, ya que estas últimas presentan un orden muy pronunciado. Todas las celulosas nativas parecen estar dispuestas en una unidad morfológica, llamada "fibrila elemental" y poseen además la misma celda cristalográfica, llamada "celulosa I". Por el contrario, las celulosas regeneradas poseen otra celda cristalográfica, llamada "celulosa II", que fue considerada ser termodinámicamente más estable. Este hecho parecería indicar que la estructura fina cristalográfica de la celulosa nativa sería una consecuencia de la biosíntesis. Por esta razón cabría suponer que la molécula celulósica durante su síntesis no llegó a estar disuelta, es decir, biosíntesis y cristalización toman lugar simultáneamente. Sin embargo recientes investigaciones por medio de microscopía electrónica y difracción electrónica, realizadas con celulosa precipitada de soluciones muy diluidas, mostraron los siguientes resultados ([30]):

1º celulosa precipitada puede formar espontáneamente fibrilas, cuya celda cristalográfica corresponde a la celulosa I,

2º las moléculas celulósicas del material precipitado están orientadas en dirección del eje fibrilar, como en el caso de la celulosa nativa,

3º el análisis del ancho de las líneas de difracción indica 35 A como límite inferior de la dimensión diamétrica de las fibrilas elementales, tanto para la celulosa nativa como para la celulosa precipitada. Este valor se compara favorablemente con el encontrado por otros autores ([31, 32]), midiendo el diámetro de las fibrilas elementales por medio de microscopía

electrónica directa. Se debe subrayar sin embargo que el valor obtenido por el análisis del ancho de las líneas de difracción representa solamente el valor mínimo posible del diámetro.

Estos resultados muestran que las fibrilas de la celulosa nativa y aquellas de la celulosa precipitada de soluciones muy diluidas, coinciden en la celda unitaria cristalográfica, en la orientación de las moléculas celulósicas dentro de las fibrilas y en el ancho de las líneas en el diagrama de difracción electrónica. Fibrilas precipitadas de soluciones diluidas de celulosa II mostraron también las características de la celulosa I ([33]).

Así estos resultados indican que la morfología y la estructura cristalina de la celulosa nativa no está directamente relacionada con el proceso biosintético, al contrario de su peso molecular.

Nota. — La mayor parte de este trabajo fue realizada en el Instituto de Física-Química de la Universidad de Maguncia (Alemania), con ayuda económica de la « Deutsche Forschungsgemeinschaft ». La continuación se realiza con ayuda económica de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. La autora actúa como investigadora científica con dedicación exclusiva de la C. I. C.

BIBLIOGRAFIA

1. M. Marx-Figini y G. V. Schulz, Bioch. Biophys. Acta *112* (1966) 81.
2. M. Marx-Figini, Makromol. Chem. *16* (1955) 157.
3. M. Marx-Figini y G. V. Schulz, Makromol. Chem. *54* (1962) 102.
4. M. Marx-Figini, Das Papier *16* (1962) 551.
5. — Makromol. Chem. *32* (1959) 233.
6. M. Marx-Figini y G. V. Schulz, Makromol. Chem. *62* (1963) 49.
7. M. Marx-Figini y E. Penzel, Makromol. Chem. *87* (1965) 307.
8. M. Marx-Figini, Makromol, Chem. *68* (1963) 227.
9. — J. Polymer Sce. C. *Nº 16* (1967) 1947.
10. — Nature *210* (1966) 755.
11. — Biochim. Biophys. Acta *177* (1969) 25.
12. — Makromol. Chem. *80* (1964) 235.
13. — Makromol. Chem. *97* (1966) 282.
14. — J. Polymer Sci. *30* (1958) 119.
15. D. A. Goring y T. E. Timell, Tappi *48* (1962) 454.
16. M. Marx-Figini, Nature *210* (1966) 755.

17. G. A. Barber y W. Z. Hassid, Nature *207* (1965) 295.
18. G. Franz, Verhandl. Schweiz. Naturf. Ges. *1967*, 134.
19. M. C. Ledbetter y K. R. Porter, J. Cell. Biol. *19* (1963) 239.
20. E. H. Newcomb y P. K. Hepler, J. Cell Biol. *20* (1964) 529.
21. F. B. P. Wooding y D. H. Northcote, J. Cell Biol. *23* (1964) 327.
22. J. Cronshaw y B. Bouck, J. Cell Biol. *24* (1965) 415.
23. M. Marx-Figini, publicación en preparación.
24. E. Macchi y M. Marx-Figini, publicación en preparación.
25. G. Casperson, Faserforschg. und Textiltechn. *17* (1966) 243.
26. A. Resch, comunicación personal.
27. K. Mühlethaler, Ann. Rev. Plant. Physiol. *18* (1967) 1.
28. C. L. Villemez, J. M. NcNab y P. Albersheim, Nature *218* (1968) 878.
29. M. Marx-Figini, publicación en preparació.
30. E. Macchi, M. Marx-Figini y E. W. Fischer, Makromol. Chem. *120* (1968) 25.
31. K. Mühlethaler, Beihefte Zeitschr. Schweizer Forstverw. *30* (1960) 55.
32. A. N. J. Heyn, J. Cell Biol. *29* (1966) 181.
33. E. Macchi y A. Palma, Makromol. Chem. *123* (1969).

NORMAS PARA LOS AUTORES

1. ANALES publica unicamente trabajos originales e inéditos ; solamente por excepción podrá incluir trabajos cuya noticia se haya dado por otra publicación.
2. La publicación en ANALES es gratuita. Las separatas que soliciten los autores (o las entidades a que estén vinculados) son con cargo a los mismos. El requerimiento deberá hacerse por escrito y antes de iniciar la impresión.
3. Los autores son personalmente responsables de la tesis y del contenido de sus trabajos y deberán realizar las correcciones de las pruebas de imprenta de dichos trabajos.
4. La Sociedad Cientifica Argentina se reserva el derecho de rechazar cualquier trabajo que sea sometido para publicación en ANALES, si así lo considerara conveniente.
5. Los trabajos deberán ser presentados escritos a máquina, a doble espacio, en papel tamaño oficio o carta, utilizando una sola de las caras del papel y redactados en castellano. Las fórmulas podrán ir manuscritas y deberán ser suficientemente claras para la labor de la imprenta. Los gráficos se dibujarán en tinta china, o por otro medio, de manera tal de permitir la fácil y buena preparación de los clisés ; esto último es aplicable a todo tipo de ilustración. La cantidad será la mínima compatible con las necesidades de la buena comprensión del trabajo.
6. Los trabajos, luego de su título, llevarán un resumen en castellano y otro en idioma extranjero, éste último de no más de 150 palabras. Dichos resúmenes deberán señalar el problema planteado, la indicación de los procedimientos y procesos y las conclusiones a que se arribe, y hacer referencia sobre la precisión de los resultados, todo ello de manera sintética.
7. Los escritos originales, destinados a la Dirección de ANALES, serán remitidos a la Administración de la Sociedad, Avenida Santa Fe 1145, Capital Federal, a efectos de registrar fecha de entrega y posterior envío al Director.
8. La publicación de los trabajos, una vez aceptados, estará sujeta a las posibilidades de la Sociedad y a las exigencias de diagramación de ANALES. La Sociedad se reserva el derecho de determinar la entrega de ANALES en la cual aparecerán los trabajos.

Correo Argentino
Cent. (B)

FRANQUEO PAGADO
Concesión Nº 1186

TARIFA REDUCIDA
Concesión Nº 6247